



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Σχολή Θετικών Επιστημών

Τμήμα Βιολογίας

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής

Διδακτορική Διατριβή

*Μελέτη των μεταβολών στην ομοιοστασία
του πρωτεώματος κατά τη γήρανση -
βιολογικός ρόλος των κύριων
πρωτεολυτικών συστημάτων*

Ελένη Ν. Τσακίρη

Πτυχιούχος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής

Αθήνα 2014



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

Σχολή Θετικών Επιστημών

Τμήμα Βιολογίας

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής

Διδακτορική Διατριβή με θέμα:

**«Μελέτη των μεταβολών στην ομοιοστασία
του πρωτεώματος κατά τη γήρανση -
βιολογικός ρόλος των κύριων πρωτεολυτικών
συστημάτων»**

Ελένη Ν. Τσακίρη

Πτυχιούχος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής

Αθήνα 2014

Επταμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- Ιωάννης Τρουγκάκος, *Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ (Επιβλέπων)*
- Σπύρος Ευθυμιόπουλος, *Καθηγητής, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ*
- Ισιδώρα Παπασιδέρη, *Καθηγήτρια, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ*

Μέλη της Επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

- Σπύρος Ευθυμιόπουλος, *Καθηγητής, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ*
- Ισιδώρα Παπασιδέρη, *Καθηγήτρια, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ*
- Ανδρέας Σκορίλας, *Καθηγητής, Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ*
- Παναγούλα Κόλλια, *Επίκουρη Καθηγήτρια, Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ*
- Δημήτριος Στραβοπόδης, *Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ*
- Ιωάννης Τρουγκάκος, *Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ*
- Ουρανία Τσιτσιλώνη, *Επίκουρη Καθηγήτρια, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ*

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή με θέμα “**Μελέτη των μεταβολών στην ομοιοστασία του πρωτεώματος κατά τη γήρανση - βιολογικός ρόλος των κύριων πρωτεολυτικών συστημάτων**” πραγματοποιήθηκε στον τομέα Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής (Οκτώβριος 2010- Ιούλιος 2014) και αποτελεί συνέχεια της μεταπτυχιακής εργασίας μου στα πλαίσια του διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική» του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ).

Κατά τη διάρκεια της Διατριβής μου Διευθυντές του τομέα υπήρξαν ο Ομότιμος Καθηγητής κ. Λουκάς Μαργαρίτης, καθώς και ο νυν Διευθυντής Καθηγητής κ. Σταύρος Χαμόδρακας, τους οποίους ευχαριστώ θερμά, όπως και όλα τα μέλη του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής για το άψογο κλίμα όλα αυτά τα χρόνια.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους παρακάτω Ευρωπαϊκούς οργανισμούς για την οικονομική υποστήριξη κατά τη διάρκεια της παρούσας ΔΔ.



EU project INsPiRE/REGPOT-CT-2011-284460

«Η έγκριση διδακτορικής διατριβής υπό του Βιολογικού Τμήματος της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλεί αποδοχήν των γνώμων του συγγραφέα».

(Ν. 5343/1932, Άρθρο 202, Παρ. 2)

Πρόλογος

Ένα ευχαριστώ από καρδιάς στον Επίκουρο Καθηγητή *Ιωάννη Τρουγκάκο*, υπεύθυνο της ΔΔ (Διδακτορικής Διατριβής) μου, που όλο αυτό το διάστημα με το μοναδικό μεράκι και πάθος για τη δουλειά του, μου προσέφερε γνώση, βοήθεια, ένα άψογο περιβάλλον εργασίας και ευκαιρίες για να εξελιχθώ ως ερευνήτρια, προκειμένου να κάνω ένα από τα όνειρά μου πραγματικότητα. Ελπίζω και εύχομαι να συνεχίσει να προσφέρει με τον ίδιο ρυθμό στο Τμήμα Βιολογίας, καθώς και να δίνει γνώση και ευκαιρίες και σε επόμενους φοιτητές.

Να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια κ. Ισιδώρα Παπασιδέρη, μέλος της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής για την τιμή που μου έκανε να είναι μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής, καθώς και για τη γνώση και τη βοήθεια που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια.

Τον Καθηγητή κ. Σπύρο Ευθυμιόπουλο τον ευχαριστώ για την τιμή να είναι στη Συμβουλευτική Επιτροπή, καθώς και για το χρόνο και τις συμβουλές του όλο αυτό το διάστημα.

Να ευχαριστήσω επίσης όλα τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Ανδρέα Σκορίλα, την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Παναγούλα Κόλλια, την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Ουρανία Τσιτσιλώνη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημήτριο Στραβοπόδη για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην κρίση της ΔΔ μου. Ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Δημήτριο Στραβοπόδη για την προθυμότητά του να με βοηθήσει όποτε χρειάστηκε, καθώς και για τις συμβουλές του. Επίσης, να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή κ. Ανδρέα Σκορίλα, καθώς και την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Ουρανία Τσιτσιλώνη και τις συνεργάτιδες της Δρ. Κική Ιωάννου και Δρ. Πηνελόπη Σαμαρά για την αγαστή συνεργασία που είχαμε αυτό το διάστημα.

Να ευχαριστήσω ακόμη τη Λέκτορα κ. Μαριάννα Αντωνέλλου για τη βοήθεια και τη γνώση που μου προσέφερε κατά τη διεκπαιρέωση της ΔΔ μου και για την προθυμία της να συζητάμε κάθε τεχνικό θέμα ή προβληματισμό μου. Την Δρ. Τριανταφυλλιά Ντουρούπη για τη βοήθεια και τη γνώση που μου μετέφερε στην αρχή ιδιαίτερα της Διατριβής μου. Τους Δρ. Θανάση Βελέντζα και Δρ. Παναγιώτη Βελέντζα για τη βοήθειά τους, όποτε τους χρειάστηκα.

Να ευχαριστήσω τους εξωτερικούς συνεργάτες μας Καθηγητή κ. Βασίλειο Γοργούλη (*Τμήμα Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, Ιατρική σχολή, ΕΚΠΑ*), καθώς και τις συνεργάτιδες του, τη Δρ. Μαρία Σιδερίδου και την Υποψήφια Διδάκτορα Ειρήνη Κομσέλη για τη βοήθειά τους σε τεχνικές Μοριακής Βιολογίας και στην τεχνική της ανοσοϊστοχημείας, αντίστοιχα.

Επίσης να ευχαριστήσω τους Καθηγητές κ. Μελέτιο Δημόπουλο και κ. Ευάγγελο Τέρπο (*Τμήμα Κλινικής Θεραπευτικής, Ιατρική σχολή, ΕΚΠΑ*) για τη σημαντική βοήθειά τους στα πειράματα με τους αναστολείς του πρωτεασώματος.

Να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη (*Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ*) και τους

συνεργάτες του για την άψογη συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια και συνεχίζουμε να έχουμε.

Να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Dirk Bohmann (*Department of Biomedical Genetics, University of Rochester Medical Center, Rochester*) και τον Δρ. κ. Γεράσιμο Συκιώτη (*Chef de clinique adjoint Service d'Endocrinologie, Diabétologie et Métabolisme Bureau, Lausanne*) για την προσφορά των διαγονιδιακών στελεχών που αφορούν στο αντιοξειδωτικό μονοπάτι Nrf2/Keap1, διότι χωρίς αυτή τη συνεργασία, αρκετά πράγματα δεν θα ήταν υλοποιήσιμα.

Να ευχαριστήσω επίσης τον Καθηγητή κ. Tilman Grune (*Institute of Nutrition, Department of Nutritional Toxicology, Friedrich Schiller University Jena, Germany*) και τους συνεργάτες του για τη συνεργασία που είχαμε και για τη σημαντική βοήθειά τους στην παρασκευή των συνθετικών AGEs και της λιποφουσκίνης. Ακόμη, να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κ. Maria Figuirera-Pereira (*Department of Biological Sciences, Hunter College, New York*) για τη σημαντική προσφορά του αντισώματος έναντι της β5 υπομονάδας του πρωτεασώματος.

Τέλος, να ευχαριστήσω για άλλη μια φορά τον Διευθυντή του Τομέα κ. Σταύρο Χαμόδρακα και όλα τα μέλη του Τομέα, καθώς και όλα τα παιδιά που συνυπάρξαμε στον ίδιο χώρο και διατηρήσαμε ένα υπέροχο κλίμα. Ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τις Υποψήφιες Διδάκτορες Αρετή Μαντά για την όμορφη συνεργασία που είχαμε και τη Νίκη Σαγιόγλου για τη βοήθειά της, όποτε τη χρειάστηκα.

Κλείνοντας ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα τωρινά μέλη της ερευνητικής ομάδας «Μοριακής –Κυτταρικής γήρανσης και καρκινογένεσης»: Sesti Fabiola, PhD, Νιφόρου Κατερίνα, PhD, Χειμωνίδου Χριστίνα, MSc, Σκληρού Αιμιλία, MSc, Παπανάγνου Ελδήνα, Ηλιάκη Πόπη, Χατζηγεωργίου Σοφία, Ευαγγελάκου Ζωή και Λιάκη Βίκυ.

Επίσης ευχαριστώ τα παλαιότερα μέλη της ομάδας μας: Ταλλά Κώστα, Βακάκη Παντελή, Τσιλίδου Νίκη, Γρίβα Ιωάννη, Γεωργέλλου Κωνσταντίνα και Κομσέλη Ειρήνη.

Τους ευχαριστώ θερμά για το υπέροχο κλίμα συνεργασίας και φιλίας που είχαμε και έχουμε όλο αυτό το διάστημα. Μέσα από τις όμορφες συζητήσεις, επιτυχίες και αποτυχίες που μοιραστήκαμε, τα κοινά μας ταξίδια, μου προσέφεραν στιγμές που θα τις θυμάμαι για πάντα.

Το τελευταίο ευχαριστώ **στους γονείς μου, τα αδέρφια μου και τον αγαπημένο μου Βασίλη**. Σε αυτούς τους ανθρώπους που με στήριξαν και μου έδωσαν την ευκαιρία και την ελευθερία να προσπαθώ να κάνω τα όνειρά μου πραγματικότητα.

☛ **Αφιερώνω λοιπόν την εργασία αυτή σε εκείνους**

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	14
1.1. Η γήρανση	14
1.2. Το σύστημα της ουβικιτίνης.....	18
1.2.1. Τα ένζυμα σύζευξης της ουβικιτίνης	18
1.2.2. Η «μοίρα» των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών.....	20
1.2.3. Η ανακύκλωση της ουβικιτίνης	21
1.3. Το πρωτεάσωμα.....	21
1.3.1. Το 20S καταλυτικό κέντρο (CP): δομή, λειτουργία και αυτοσυγκρότηση.....	21
1.3.2. Το 19S ρυθμιστικό σύμπλοκο (RP): δομή, λειτουργία και συγκρότηση.....	24
1.3.3. Εναλλακτικές μορφές πρωτεασώματος	26
1.3.4. Ενδοκυτταρική εντόπιση και ρύθμιση του πρωτεασώματος	27
1.3.5. Λειτουργική επικοινωνία μεταξύ του μονοπατιού σηματοδότησης ουβικιτίνης- πρωτεασώματος και των άλλων μονοπατιών σηματοδότησης που εμπλέκονται στη διατήρηση της πρωτεόστασης	30
1.3.5.1. Το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και τα άλλα πρωτεολυτικά συστήματα	30
1.3.5.2. Το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και το δίκτυο των μοριακών συνοδών	31
1.3.5.3. Το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και οι κυτταρικές αντιοξειδωτικές αποκρίσεις	33
1.4. Η ρύθμιση του συστήματος ουβικιτίνης κατά την κυτταρική γήρανση και την <i>in vivo</i> γήρανση	34
1.5. Μεταβολές του πρωτεασώματος κατά την κυτταρική και την <i>in vivo</i> γήρανση	35
1.6. Μη ενζυματικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις κατά τη γήρανση: Λιποφουσκίνη- Τελικά Προϊόντα Πρωτεϊνικής Γλυκοζυλίωσης (AGEs)	37
2. ΣΚΟΠΟΣ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ	40
2.1. Σκοπός	40
2.2. Το έντομο <i>Drosophila melanogaster</i>	40
2.2.1. Φυσιολογική ανάπτυξη της <i>Drosophila</i>	41
2.2.1.1. Ωογένεση	41
2.2.1.2. Εμβρυογένεση	42
2.2.1.3. Στάδια της προνύμφης	42
2.2.1.4. Το ενήλικο άτομο	42
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	44
3.1. Υλικά	44
3.1.1. Χημικά αντιδραστήρια.....	44
3.1.2. Αντισώματα	46

3.1.3. PCR εκκινητές (PCR primers).....	46
3.1.4. Διαγονιδιακά στελέχη <i>Drosophila melanogaster</i>	48
3.1.4.1. Η τροφή των εντόμων.....	52
3.1.5. Διαδικασία παρασκευής της τροποποιημένης με σάκχαρα αλβουμίνης του ορού [BSA (Bovine serum albumin)] [Advanced Glycation End-modified BSA (AGE-modified BSA)] και της συνθετικής λιποφουσκίνης.....	52
3.1.6. Κυτταροκαλλιέργειες.....	53
3.1.6.1. Διατήρηση και ανακαλλιέργεια των κυττάρων	53
3.1.6.2. Αποθήκευση των κυττάρων.....	54
3.1.7. Διαλύματα.....	55
3.2. Μέθοδοι.....	55
3.2.1. Ανατομία ωοθηκών και σπερματοθηκών του εντόμου <i>Drosophila melanogaster</i>	56
3.2.1.1. Ανατομία ωοθηκών.....	56
3.2.1.2. Ανατομία σπερματοθηκών	56
3.2.2. Δοκιμή γευστικότητας	56
3.2.3. Έλεγχος της κινητικότητας των εντόμων	57
3.2.4. Έλεγχος της βιωσιμότητας των εντόμων.....	57
3.2.5. Απομόνωση αιμολέμφου από ενήλικα έντομα	57
3.2.6. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	57
3.2.7. SDS PAGE – Ανοσοστύπωμα (Western)	58
3.2.8. Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεασωμάτων	58
3.2.9. Ανοσοϊστοχημεία πρωτεασώματος σε τομές από ολόκληρα έντομα.....	59
3.2.10. Μέτρηση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS assay).....	59
3.2.11. Μέτρηση των τροποποιημένων πρωτεϊνών και λιπιδίων με σάκχαρα (Advanced Glycation End products-AGEs)	60
3.2.12. Μέτρηση της πρωτεΐνης GFP (Green Fluorescent Protein) με φθορισμομετρία.....	60
3.2.13. Αντίστροφη μεταγραφή mRNA (παραγωγή cDNA)	60
3.2.14. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR, Q-RT-PCR) .	61
3.2.15. Καταγραφή των τριών ενζυμικών πρωτεασωμικών ενεργοτήτων.....	62
3.2.16. Μέτρηση των ενδογενών επιπέδων H ₂ O ₂ σε σωματικούς ιστούς.....	63
3.2.17. Απομόνωση μιτοχονδρίων από σωματικούς ιστούς των εντόμων.....	63
3.2.18. Μέτρηση της ενεργότητας της μιτοχονδριακής ηλεκτρικής αφυδρογονάσης	63
3.2.19. Μέτρηση της ενεργότητας του μιτοχονδριακού συμπλέγματος II/III	63
3.2.20. Μέτρηση της ενζυματικής ενεργότητας των καθεψινών B και L.....	63
3.2.21. Χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης (Confocal Laser Scanning Microscope-CLSM)	64

3.2.22. Αναστολή της πρωτεασωμικής ενεργότητας κατά τη γαμετογένεση ή κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου	64
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	66
4.1. Η γήρανση στους σωματικούς ιστούς στη <i>Drosophila</i> χαρακτηρίζεται από αύξηση του οξειδωτικού στρες και συσσώρευση των AGEs, παρά την ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής απόκρισης.....	66
4.2. Η ενζυμική ενεργότητα και έκφραση του πρωτεασώματος μειώνεται στους σωματικούς ιστούς κατά τη γήρανση	67
4.3. Οι γονάδες (ωοθήκες και σπερματοθήκες) των γηρασμένων εντόμων διατηρούν σημαντικά επίπεδα έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων, καθώς και υψηλά επίπεδα ενζυμικής ενεργότητας του πρωτεασώματος	70
4.4. Οι γονάδες των νεαρών εντόμων διαθέτουν πιο άφθονα και πιο ενεργά πρωτεασώματα σε σύγκριση με τους σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων.....	74
4.5. Τα πρωτεασώματα των γονάδων (ανεξαρτήτως ηλικίας) είναι πιο ανθεκτικά στο οξειδωτικό στρες – διατήρηση των μηχανισμών αντιοξειδωτικής απόκρισης ανεξαρτήτως ηλικίας στις γονάδες.....	76
4.6. Η μειορρύθμιση της έκφρασης των πρωτεασωμικών γονιδίων στους σωματικούς ιστούς κατά τη γήρανση σχετίζεται με την απώλεια λειτουργικότητας του μονοπατιού σηματοδότησης Nrf2-CncC/Keap1	80
4.7. Η RNAi-επαγόμενη καταστολή της έκφρασης των υπομονάδων β5 και α7 του 20S πρωτεασώματος προκαλεί μείωση της ενεργότητας του πρωτεασώματος και θνησιμότητα σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια.....	82
4.8. Η φαρμακολογική αναστολή του πρωτεασώματος σε ενήλικα έντομα προκαλεί διαταραχή της πρωτεόστασης, μείωση της κινητικής ικανότητας, καθώς και σε δοσο-εξαρτώμενη μείωση του προσδόκιμου ζωής των εντόμων	84
4.9. Η μερική αναστολή της πρωτεασωμικής ενεργότητας προκαλεί επαγωγή της γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων με ηλικιο- και ιστο-εξαρτώμενο τρόπο	87
4.10. Η πρωτεασωμική δυσλειτουργία σηματοδοτείται από την αύξηση του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου (ROS) εξαιτίας της διαταραχής της μιτόστασης.....	93
4.11. Η δυσλειτουργία του πρωτεασώματος προκαλεί επαγωγή της έκφρασης των πρωτεασωμικών γονιδίων μέσω ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2/CncC..	98
4.12. Χαρτογράφηση των επιπτώσεων της RNAi-επαγόμενης <i>in vivo</i> καταστολής της έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων στη φυσιολογία του οργανισμού.....	107
4.13. Η RNAi-επαγόμενη μείωση της έκφρασης των υπομονάδων του 20S και 19S πρωτεασώματος προκαλεί αύξηση της γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης του πρωτεασώματος και αύξηση του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου	109

4.14. Η χορήγηση μέσω της τροφής τροποποιημένων AGEs ή λιποφουσκίνης σε νεαρά έντομα προκαλεί πρόωμη γήρανση, καθώς και αύξηση των οξειδωμένων πρωτεϊνών και των ενδογενών επιπέδων των πρωτεϊνών που έχουν τροποποιηθεί με AGEs.....	111
4.15. Η λήψη τροφής πλούσια σε AGEs ή λιποφουσκίνη μειώνει την ενζυμική ενεργότητα του πρωτεασώματος	115
4.16. Η παρατεταμένη λήψη τροφής πλούσιας σε AGEs ή λιποφουσκίνη προκαλεί αύξηση της ενεργότητας των καθεψινών του λυσοσώματος, οι οποίες συμβάλλουν στη μείωση της κυτταροτοξικότητας που προκαλούν τα AGEs ή η λιποφουσκίνη.....	118
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	122
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	135
7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	154
8. ABSTRACT	159
9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι : ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΜΑΚΡΟΒΙΟΤΗΤΑΣ ..	162
10. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ: ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	167

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AGEs	Advanced glycation End products Τελικά προϊόντα πρωτεϊνικής γλυκοζυλίωσης
APS	Ammonium persulphate Υπερθειικό αμμώνιο
ATP	Adenosine Triphosphate Τριφωσφορική αδενοσίνη
BSA	Bovine serum albumin Αλβουμίνη ορού βοός
CaCl ₂	Calcium chloride Χλωριούχο ασβέστιο
cDNA	Complementary DNA Συμπληρωματικό DNA
CH ₃ COOH	Acetic acid Οξικό οξύ
ClCH ₂ COONa	Sodium chloroacetate Χλωροξικό νάτριο
CncC	cap'n'collar isoform C
CO ₂	Carbon dioxide Διοξείδιο του άνθρακα
DMSO	Dimethylsulfoxid Διμεθυλ-σουλφοξείδιο
DNP	Dinitrophenyl Δινιτροφαίνυλο
DTT	Dithiothreitol Διθειοθρεϊτόλη
dH ₂ O	Distilled water Απεσταγμένο νερό
EDTA	Ethylenediamine-tetra-acetic acid Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid Αιθυλενο-γλυκόλη τετραοξικού οξέος
EtBr	Ethidium bromide Βρωμιούχο αιθίδιο
EtOH	Ethanol Αιθανόλη
GFP	Green Fluorescence Protein Πράσινη Φθορίζουσα πρωτεΐνη
Hepes	N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid N-2-υδροξυαιθυλοπιπεραζινο-N-2-αιθανοσουλφονικό οξύ
KCl	Potassium chloride Χλωριούχο κάλιο
KCN	Potassium cyanide Κυανιούχο κάλιο
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1

Maf	musculo aponeurotic fibrosarcoma
MetOH	Methanol Μεθανόλη
MgCl ₂	Magnesium chloride Χλωριούχο μαγνήσιο
mRNA	Messenger RNA Μήνυμα RNA
NaCl	Sodium chloride Χλωριούχο νάτριο
NaHCO ₃	Sodium bicarbonate Όξινο ανθρακικό νάτριο
Nonidet P-40 (NP-40)	Non-ionic detergent 2-[2-[4-(2,4,4-trimethylpentary)phenoxy] ethoxy] ethanol Μη ιονικό απορρυπαντικό 2-[2-[4-(2,4,4-τριμεθυπεντανυλ)φαινοξυ]αιθοξυ] αιθανόλη
Nrf2	NF-E2-related factor-2
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης
PBS	Phosphate buffered saline Διάλυμα φωσφορικών αλάτων
PCR	Polymerase chain reaction Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
RNAi	Interference RNA Παρεμβολή RNA
ROS	Reactive oxygen species Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου
SDS	Sodium dodecyl sulfate Θειικό δωδεκυλικό νάτριο
t-BHP	Tert-Butyl hydroperoxide Τριτ-βουτυλο υδροϋπεροξειδίο
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine N, N, N', N'-τετραμεθυλαιθυλενο-διαμίνη
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane Τρις-(υδροξυμεθυλ)-αμινομεθάνιο
Triton X-100	Non-ionic detergent Iso-octylphenoxy-polyethoxy-ethanol Μη ιονικό απορρυπαντικό Ισο-οκτυλοφαινοξυ-πολυαιθοξυ-αιθανόλη
v/v	Volume per volume Όγκος κατ' όγκο
w/v	Weight per volume Βάρος κατ' όγκο
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide Υπεροξειδίο υδρογόνου

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

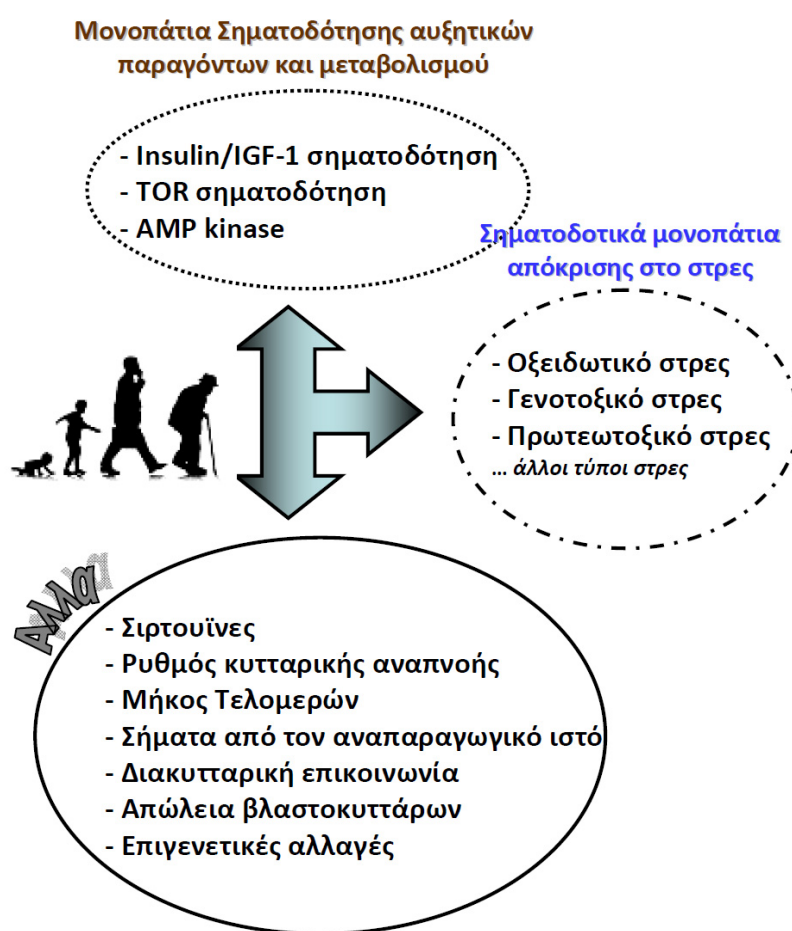
1.1 Η γήρανση

Η εμφάνιση της γήρανσης σχετίζεται με τη σταδιακή συσσώρευση βλαβών στα βιομόρια του κυττάρου κατά τη διάρκεια της ζωής, στις οποίες συμβάλλουν τόσο ενδογενείς όσο και εξωγενείς στρεσογόνοι παράγοντες (Trougakos et al., 2013; Lopez-Otin et al., 2013). Οι ενδογενείς παράγοντες αφορούν κυρίως στη γενωμική αστάθεια, δηλαδή ανακατατάξεις της χρωματίνης, βλάβη του DNA, καθώς και σμίκρυνση του μήκους των τελομερών. Στους εξωγενείς παράγοντες που σχετίζονται με το γήρας περιλαμβάνεται το περιβαλλοντικό στρες, καθώς και ο τρόπος ζωής, όπως η διατροφή και το κάπνισμα (Trougakos et al., 2013). Ωστόσο, για μεγάλο χρονικό διάστημα, οι μηχανισμοί συντήρησης της ομοιοστασίας του κυττάρου διατηρούν σε χαμηλά επίπεδα τις βλάβες στα βιομόρια απομακρύνοντας ή επιδιορθώνοντας τις βλάβες. Όμως, η «μάχη» της συντήρησης της ομοιοστασίας τελικά χάνεται, καθώς ο οργανισμός γηράσκει, με αποτέλεσμα σταδιακά να δυσλειτουργούν και τα μονοπάτια που εμπλέκονται στη διατήρηση της ομοιοστασίας. Τελικά, προκύπτει απορρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών με αποτέλεσμα την περαιτέρω συσσώρευση βλάβης που τελικά οδηγεί στην εμφάνιση του γηρασμένου ιστού, καθώς και ασθενειών που σχετίζονται με το γήρας, όπως οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες και ο καρκίνος (Campisi, 2005; Niccoli και Partridge, 2012).

Αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια έχουν εμπλακεί στην εξέλιξη του γήρατος, τα οποία περιλαμβάνονται στην πρόσφατη ανασκόπηση από τους Lopez-Otin et al. (2013) ως κάποια από τα κύρια ορόσημα (hallmarks) της γήρανσης. Κάποια από αυτά είναι τα σηματοδοτικά μονοπάτια ρύθμισης του μεταβολισμού, το μονοπάτι των σιρτουϊνών (sirtuins), οι επιγενετικές τροποποιήσεις του γονιδιώματος, η μείωση του μήκους των τελομερών, καθώς και τα σηματοδοτικά μονοπάτια κυτταρικής απόκρισης στο στρες (Argyropoulou et al., 2013; Lopez-Otin et al., 2013, Kenyon, 2010; Alic και Partridge, 2011; Tsakiri and Trougakos, υπό υποβολή). (Εικ. 1.1)

Τα κυριότερα μεταβολικά μονοπάτια που εμπλέκονται στο γήρας είναι το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης, το σηματοδοτικό μονοπάτι TOR (Target of Rapamycin) και το σηματοδοτικό μονοπάτι AMPK (AMP-activated kinase) (Kenyon, 2010; Alic και Partridge, 2011). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η καταστολή των παραπάνω μονοπατιών τόσο με γενετικό όσο και με φαρμακολογικό τρόπο οδήγησε σε αύξηση του προσδόκιμου ζωής στο ζυμομύκητα, στο *Caenorhabditis elegans*, στη *Drosophila*, καθώς και στον ποντικό (Fontana et al., 2010; Kenyon, 2010; Partridge, 2010; Selman και Withers, 2011). Συγκεκριμένα, στον άνθρωπο βρέθηκαν πολυμορφισμοί που προκαλούν μείωση έκφρασης της ορμόνης ανάπτυξης (GH; growth hormone), καθώς και της σηματοδότησης του μονοπατιού της ινσουλίνης (insulin-like growth factor-1, IGF-1) οι οποίοι συσχετίστηκαν με αυξημένο

προσδόκιμο ζωής (Bonafe et al., 2003; Suh et al., 2008). Σε αρκετά επίσης *in vivo* μοντέλα, έχειδειχθεί ότι η λήψη διατροφής με περιορισμένες θερμίδες (Caloric Restriction-CR) φαίνεται να επάγει τη μακροζωία καταστέλοντας τη σηματοδότηση των παραπάνω μονοπατιών και ενεργοποιώντας τους μεταγραφικούς παράγοντες Nrf-2 (NF-E2-related factor-2), FOXO (forkhead box O) και HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1). Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες συμμετέχουν στη μείωση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS), την ενεργοποίηση του μονοπατιού της αυτοφαγίας, καθώς και στην έκφραση μοριακών συνοδών (molecular chaperons), αντίστοιχα τα σηματοδοτικά αυτά μονοπάτια απόκρισης στο στρες φαίνεται να προστατεύουν το κύτταρο από τη συσσώρευση βλαβών (Fontana et al., 2010).



Εικόνα 1.1 Τα κύρια μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης που εμπλέκονται στο γήρας. Αφορούν στη σηματοδότηση αυξητικών παραγόντων και του κυτταρικού μεταβολισμού, στις αποκρίσεις στο στρες, καθώς και σε μια σειρά από άλλες ηλικιο-εξαρτώμενες μεταβολές (βλέπε κείμενο) (πηγή : Tsakiri και Trougakos, υπό υποβολή).

Σύμφωνα με αρκετές μελέτες, οι σιρτουΐνες εμπλέκονται στη διαδικασία της γήρανσης. Συγκεκριμένα, η ενεργότητά τους είναι απαραίτητη για την αύξηση του προσδόκιμου ζωής, που παρατηρείται μετά από λήψη τροφής με μειωμένες θερμίδες (Lin et al., 2000, 2002; Kaierson et al., 2003). Βρέθηκε επίσης, ότι η SIRT1 (στον άνθρωπο) ή η SIR2 (στο

ζυμομύκητα) έχει ενεργότητα αποακετυλάσης που εξαρτάται από NAD (Nicotinamide adenine dinucleotide). Η απαίτηση για NAD είναι ένας τρόπος με τον οποίο οι σιρτουΐνες ανταποκρίνονται στη μεταβολική κατάσταση του κυττάρου ενεργοποιώντας, μεταξύ των άλλων, τα αντιοξειδωτικά μονοπάτια και προκαλώντας μεταβολές στον ενεργειακό μεταβολισμό, ρυθμίζοντας έτσι τη διαδικασία της γήρανσης (Guarente, 2006).

Το μήκος των τελομερών κατά τον κυτταρικό διπλασιασμό φυσιολογικών ανθρώπινων κυττάρων σταδιακά μειώνεται, έως ότου φτάσει σε ένα συγκεκριμένο μήκος, στο οποίο ενεργοποιούνται οι μοριακοί μηχανισμοί της αναδιπλασιαστικής κυτταρικής γήρανσης (ΑΚΓ) (Campisi, 2001). Η ενεργοποίηση της ΑΚΓ λαμβάνει χώρα, όταν πλέον τα τελομέρη έχουν φτάσει σε τέτοιο μήκος, ώστε να μη «καλύπτουν» τα χρωμοσώματα (uncapped telomeres). Το κύτταρο «αντιλαμβάνεται» αυτή την κατάσταση ως μη επιδιορθώσιμη βλάβη στο DNA (DNA Damage Response-DDR) (Harley, 1991). Τέλος, όσον αφορά στις επιγενετικές τροποποιήσεις, η υπερμεθυλίωση των νησίδων CpG και η μεθυλίωση των ιστονών έχει δεχθεί πως μπορούν να προωθήσουν τη διαδικασία της γήρανσης (Moskalev et al., 2012; Talens et al., 2012).

Σχετικά με τα μονοπάτια απόκρισης στο στρες, στην πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στους στρεσογόνους παράγοντες βρίσκονται τα αντιοξειδωτικά μόρια (φλαβονοειδή, βιταμίνες, καροτενοειδή), τα οποία μειώνουν τα επίπεδα των ROS και των ελεύθερων ριζών αζώτου (Reactive Nitrogen Species-RNS) (McCall και Frei, 1999). Παράλληλα με τα αντιοξειδωτικά μόρια, έχουμε και τη δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων (όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η καταλάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης κ.α). Η έκφραση των περισσότερων από αυτά τα γονίδια ενεργοποιείται από τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 μέσω του μονοπατιού Nrf2/Keap1, το οποίο είναι το κύριο αντιοξειδωτικό σηματοδοτικό μονοπάτι του κυττάρου (θα περιγραφεί εκτενέστερα παρακάτω) (Kensler και Wakabayashi, 2010; Sykiotis και Bohman, 2010).

Τα παραπάνω αφορούν στην απόκριση μετά από οξειδωτικό στρες, ενώ στη συνέχεια, αν δημιουργηθεί κάποια βλάβη στα βιομόρια του κυττάρου, ενεργοποιούνται τα μονοπάτια απόκρισης σε βλάβη του DNA και/ή σε βλάβη του πρωτεώματος. Όταν γίνει «αντιληπτή» κάποια βλάβη του DNA (όπως μονές ή διπλές θραύσεις στο DNA), τότε κινητοποιείται η απόκριση σε βλάβη του DNA (DNA Damage Responses; DDR), με αποτέλεσμα αρχικά την ενεργοποίηση των μονοπατιών αναστολής κυτταρικής αύξησης• εδώ εμπλέκονται κυρίως οι άξονες σηματοδότησης του μεταγραφικού παράγοντα p53 και της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Rb) (Ramirez et al., 2001; Herbig et al., 2004).

Σε ενδεχόμενη βλάβη στο πρωτέωμα και πρόκληση πρωτεωμικής αστάθειας (proteome instability) κινητοποιούνται τα μονοπάτια απόκρισης σε βλάβη του πρωτεώματος (Protein Damage Responses; PDR). Αρχικά, ενεργοποιούνται τα συστήματα επιδιόρθωσης της βλάβης που περιλαμβάνουν το επιδιορθωτικό σύστημα πρωτεϊνών μέσω ενζύμων, δηλαδή το

σύστημα θειορεδοξίνης και γλουταρεδοξίνης, καθώς και το σύστημα Msrs (αποτελείται από τα δύο ένζυμα MsrA και MsrB)• τα ένζυμα αυτά επιδιορθώνουν τις οξειδωτικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών. Επίσης, ενεργοποιείται το σύστημα επιδιόρθωσης μέσω των μοριακών συνοδών, σύμφωνα με το οποίο αρχικά πραγματοποιείται η αναγνώριση της πρωτεΐνης που φέρει βλάβη μέσω της πρωτεΐνης Hsp70 και στη συνέχεια, προωθείται η σωστή αναδίπλωσή της, με τη συμμετοχή μιας σειράς από άλλες μοριακές συνοδούς (οι οποίες θα αναφερθούν παρακάτω), προκειμένου η μη λειτουργική πρωτεΐνη να αποκτήσει πάλι την ομαλή λειτουργία της. Αν η πρωτεΐνη δε μπορέσει να επιδιορθωθεί, τότε αποικοδομείται από τα πρωτεολυτικά συστήματα ή υφίσταται περαιτέρω οξειδωτική τροποποίηση, με αποτέλεσμα τη δημιουργία συσσωματωμάτων, όπως η λιποφουσκίνη και τα τελικά προϊόντα πρωτεϊνικής γλυκοζυλίωσης (AGEs-Advanced Glycation End products). Ο ρυθμός αποικοδόμησης των AGEs είναι σχετικά μικρός και έτσι οι τροποποιήσεις αυτές τείνουν να συσσωρεύονται κατά τη γήρανση (Balch et al., 2008; Powers et al., 2009; Trougakos et al., 2013).

Τα κύρια κυτταρικά πρωτεολυτικά μονοπάτια είναι το σύστημα αυτοφαγίας-λυσοσώματος και το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος. Το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσοσώματος αποικοδομεί μη λειτουργικά οργανίδια, συσσωματώματα πρωτεϊνών και πρωτεΐνες με μεγάλο χρόνο ζωής. Οι βασικοί τύποι αυτοφαγίας είναι η μακροαυτοφαγία, η μικροαυτοφαγία και η αυτοφαγία η οποία διαμεσολαβείται από μοριακές συνοδούς. Η μακροαυτοφαγία αποικοδομεί μεγάλα οργανίδια, όπως μιτοχόνδρια, λιποσώματα, συσσωματώματα πρωτεϊνών, καθώς και ξένους οργανισμούς (ιούς) με τη δημιουργία αυτοφαγοσωμάτων. Τα αυτοφαγοσώματα αποτελούνται από διπλή μεμβράνη και σχηματίζονται από τη συμμετοχή των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αυτοφαγία, γνωστές και ως Atgs (autophagy related proteins). Η μικροαυτοφαγία αποικοδομεί μικρότερα οργανίδια και κάποιες πρωτεΐνες με τη βοήθεια της πρωτεΐνης Hsc70, ενώ τέλος, η αυτοφαγία που διαμεσολαβείται μέσω μοριακών συνοδών αποικοδομεί πρωτεΐνες με τη βοήθεια μοριακών συνοδών που αναγνωρίζουν τη μη λειτουργική πρωτεΐνη από ένα μοτίβο αναγνώρισης που αυτή φέρει. Όλα τα μη λειτουργικά οργανίδια καθώς και τα συσσωματώματα πρωτεϊνών καταλήγουν στο λυσόσωμα είτε μέσω σύντηξης της μεμβράνης των αυτοφαγοσωμάτων με αυτή του λυσοσώματος είτε μέσω εγκόλπωσης είτε, τέλος, μέσω ειδικών συμπλόκων μεταφοράς (Cueiro και Macian, 2012). Το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος, που μελετάται στην παρούσα Διατριβή και θα περιγραφεί με λεπτομέρεια παρακάτω, είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση πρωτεϊνών με μικρό χρόνο ζωής (οι οποίες επισημαίνονται με την πρωτεΐνη ουβικιτίνη), καθώς και μη λειτουργικών και/ή οξειδωμένων πρωτεϊνών. Το σύστημα αυτό συμμετέχει σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής σηματοδότησης, του κυτταρικού θανάτου, των

αποκρίσεων του ανοσοποιητικού συστήματος, το μεταβολισμό, τον κυτταρικό κύκλο και την ανάπτυξη (Chondrogianni et al., 2012; Trougakos et al., 2013).

1.2 Το σύστημα της ουβικιτίνης

Η ουβικιτίνη (Ubiquitin-Ub) είναι μια μικρή πρωτεΐνη 76 αμινοξέων. Είναι συντηρημένη μεταξύ των ευκαρυωτικών οργανισμών και, αν και δεν εκφράζεται στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, έχουν βρεθεί πρωτεΐνες που έχουν παρόμοια δομή και λειτουργία με την ουβικιτίνη και με τα ένζυμα που συμμετέχουν στην ουβικιτινίωση (Iyer et al., 2006; Lehmann et al., 2006; Sharp και Li, 1987). Η ουβικιτίνη μπορεί να σχηματίσει διαφορετικού μήκους αλυσίδες, στις οποίες τα μόρια ουβικιτίνης μπορούν να συνδεθούν μεταξύ τους στις θέσεις καταλοίπων λυσίνης (Lys-K) 6, 11, 27, 29, 33, 48 και 63.

Επίσης, η μεθειονίνη στο αμινο-τελικό άκρο μιας ουβικιτίνης μπορεί να συνδεθεί με το μοτίβο δι-γλυκίνης (di-glycine) στο καρβοξυτελικό άκρο μιας άλλης ουβικιτίνης. Η ουβικιτίνη προσδένεται στις πρωτεΐνες είτε ως μονομερές, είτε με τη μορφή μιας αλυσίδας πολυ-ουβικιτίνης μέσω μιας ενζυματικής αντίδρασης γνωστής ως ουβικιτινίωση. Με τον τρόπο αυτό ρυθμίζεται η «μοίρα» των πρωτεϊνών που τροποποιούνται με αυτή τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα (von Mikecz, 2006).

1.2.1. Τα ένζυμα σύζευξης της ουβικιτίνης

Η σύνδεση της ουβικιτίνης στις πρωτεΐνες είναι ATP (Adenosine Triphosphate)-εξαρτώμενη και διαμεσολαβείται από μια σειρά ενζύμων. Συγκεκριμένα, η ουβικιτίνη ενεργοποιείται (μέσω κατανάλωσης ATP) από το ένζυμο ενεργοποίησης της ουβικιτίνης E1, και μεταφέρεται στο ενεργό κέντρο του καταλοίπου κυστεΐνης (Cys) του ενζύμου E1. Η ενεργοποιημένη ουβικιτίνη στη συνέχεια μεταφέρεται στο ενεργό κέντρο της οικογένειας ενζύμων σύζευξης της ουβικιτίνης E2. Τελικά, οι λιγότερες της ουβικιτίνης, γνωστές ως E3, συνδέουν την καρβοξυλική ομάδα του καρβοξυτελικού άκρου του καταλοίπου γλυκίνης της ουβικιτίνης με την ε-αμινοομάδα μιας λυσίνης του υποστρώματος-πρωτεΐνης στόχου (Herzhko και Ciechanover, 1998) (Εικ. 1.2).

Υπάρχει μόνο ένα ένζυμο E1 (Uba1), το οποίο ενεργοποιεί την ουβικιτίνη, ενώ πρόσφατα βρέθηκε στον άνθρωπο και ένα δεύτερο, το UBHE1L2, το οποίο φαίνεται να έχει οργανο-ειδική λειτουργία (Kulkarni και Smith, 2008; Lee et al., 2008; Pelzer et al., 2007). Από την άλλη πλευρά, τα E2 ένζυμα είναι περίπου τριάντα στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Bergink και Jentsch, 2009) και χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας άκρως συντηρημένης καταλυτικής δομής 14-16 kDa.

Στη δομή αυτή προσδένεται η ενεργοποιημένη ουβικιτίνη μέσω ενός ομοιοπολικού θειολεστερικού δεσμού με το καταλυτικό κέντρο. Τα γονίδια των ενζύμων E2 είναι διασπαρμένα στο γονιδίωμα, εκφράζονται σε όλους τους ιστούς και χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με την προέκταση της καταλυτικής τους περιοχής. Κάποια E2 ένζυμα έχουν μόνο την καταλυτική περιοχή (ανήκουν στην τάξη I), άλλα έχουν επιπλέον αμινο- (τάξη II) ή καρβοξυ- (τάξη III) τελικές επεκτάσεις και κάποια έχουν και τις δύο προεκτάσεις (τάξη IV) (van Wijk και Timmers, 2010).

Τέλος, οι E3 λιγάσες είναι πάνω από τριακόσια μέλη και χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τις λιγάσες με δομή HECT (homologous to E6-AP terminus) και τις λιγάσες με δομή RING (Really Interesting New Gene) (Deshaies και Joazeiro, 2009; Huibregtse et al., 1995; Metzger et al., 2012). Οι λιγάσες HECT έχουν μια μεγάλη δομή από 350 αμινοξέα με ένα καταλυτικό κατάλοιπο κυστεΐνης, το οποίο δέχεται την ενεργοποιημένη ουβικιτίνη από το E2 ένζυμο και τη μεταφέρει στο υποστρώμα δημιουργώντας ένα ισοπεπτιδικό δεσμό με το καρβοξυτελικό άκρο της ουβικιτίνης και την ε-αμινοομάδα της λυσίνης του υποστρώματος. Οι λιγάσες RING διαθέτουν μια μεγάλη επιφάνεια πάνω στην οποία πραγματοποιείται η σύνδεση μεταξύ της ενεργοποιημένης ουβικιτίνης και του υποστρώματος με ισοπεπτιδικό δεσμό (Deshaies και Joazeiro, 2009; Metzger et al., 2012) (Εικ. 1.2).

Εχειδειχθεί επίσης ότι υπάρχουν κάποιες λιγάσες, με επικράτειες U-box (UFD2-homology domain) και PHD (Plant Homeo Domain), που αλληλεπιδρούν με μοριακές συνοδούς και εμπλέκονται έτσι στη διατήρηση της πρωτεόστασης (Metzger et al., 2012; Murata et al., 2003).

Ακόμη, οι λιγάσες SCF (Skp, Cullin, F-box containing complex) και APC (anaphase-promoting complex) έχουν εμπλακεί σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής ανάπτυξης και της διαφοροποίησης (Skaar και Pagano, 2009). Τέλος, η ουβικιτινίωση των πρωτεϊνών είναι μια κύρια διεργασία και για το ενδοπλασματικό δίκτυο, άλλα και για το μιτοχόνδριο για την απομάκρυνση μη λειτουργικών πρωτεϊνών (βλέπε παρακάτω).

1.2.2. Η «μοίρα» των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών

Ο συνδυασμός των E2 και E3 ενζύμων, τα οποία καταλύουν το σχηματισμό της αλυσίδας ουβικιτίνης, και αφορά είτε σε μονοουβικιτινίωση (προσθήκη ενός μορίου ουβικιτίνης στο υπόστρωμα) είτε σε πολυουβικιτινίωση (προσθήκη αλυσίδας ουβικιτίνης στο υπόστρωμα), μαζί με την επικράτεια πρόσδεσης της ουβικιτίνης (Ubiquitin Binding Domain-UBHD) που διαθέτουν οι πρωτεΐνες ρυθμίζουν τη «μοίρα» των πρωτεϊνών στόχων (Ikeda et al., 2010). Οι UBDs εμφανίζουν κυρίως δομή α-έλικας, δακτύλου ψευδάργυρου (zinc finger), καθώς και πτυχώσεις με ομολογίες πλεκστρίνης [pleckstrin homology (Pru)] (Dikic et al., 2009). Οι UBDs διαθέτουν επιλεκτικότητα για τον τύπο της αλυσίδας ουβικιτίνης, με τον οποίο θα αλληλεπιδράσουν. Για παράδειγμα, η δομή Pru που διαθέτει η πρωτεασωματική υπομονάδα Rpn13 αλληλεπιδρά με αλυσίδα δύο μορίων ουβικιτίνης που έχουν συνδεθεί μεταξύ τους στο κατάλοιπο λυσίνης 48 (K-48) (Husnjak et al., 2008).

Επίσης, το μήκος της αλυσίδας ουβικιτίνης εμπλέκεται στον προορισμό που θα ακολουθήσει η πρωτεΐνη στόχος μετά τη σήμανσή της. Παρόλου που μια αλυσίδα πολλών μορίων ουβικιτίνης (πολυουβικιτίνης) αφορά κύρια σε πρωτεΐνες που προορίζονται για αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα, η ουβικιτινίωση εμπλέκεται και σε άλλες κυτταρικές διεργασίες, όπως οι αποκρίσεις του ανοσοποιητικού συστήματος, η ενδοκύτωση των πρωτεϊνών και η ενδοκυτταρική μεταφορά, η ρύθμιση της μεταγραφής, καθώς και η επιδιόρθωση του DNA (Hochstrasser, 2009). Για παράδειγμα, η αλυσίδα πολλών μορίων ουβικιτίνης, τα οποία έχουν συνδεθεί μεταξύ τους στο κατάλοιπο λυσίνη 63 (K-63) παίζει σημαντικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς εμπλέκεται στη ρύθμιση της σηματοδότησης των μονοπατιών NF-κB (nuclear factor-kappa B), του υποδοχέα TLR (Toll-like receptors), της ιντερλευκίνης 1R (Interleukin-1, IL-1R) και του παράγοντα TNF (Tumor necrosis factor). Επίσης, φαίνεται να εμπλέκεται και στην επιδιόρθωση του DNA (Bhoj και Chen, 2009; Bergink και Jentsch, 2009; Hofmann και Pickart, 1999). Η μονοουβικιτινίωση φαίνεται να είναι από τα πρώτα σήματα για την ενδοκύτωση των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης, καθώς και για την αποικοδόμηση πρωτεϊνών μέσω του λυσοσώματος (Haglund et al., 2003), αν και έχειδειχθεί πως συμμετέχει επίσης στη ρύθμιση της μεταγραφής, καθώς και στην τροποποίηση ιστονών (Moore et al., 2002; Muratani και Tansey, 2003; Zhang, 2003).

Η πιο συχνή πρωτεϊνική σήμανση με ουβικιτίνη είναι η αλυσίδα πολλών μορίων ουβικιτίνης, τα οποία έχουν συνδεθεί μεταξύ τους στο κατάλοιπο λυσίνη 48 (K-48). Η τροποποίηση αυτή αφορά σε πρωτεΐνες που προορίζονται για αποικοδόμηση μέσω του πρωτεασώματος, όπως για παράδειγμα μικρού χρόνου ζωής πρωτεΐνες που παίζουν βασικό ρόλο κατά τον κυτταρικό κύκλο (Hershko και Ciechanover, 1998). Επιπλέον, αλυσίδα πολλών μορίων ουβικιτίνης, τα οποία έχουν συνδεθεί μεταξύ τους στο κατάλοιπο λυσίνη 11 (K-11) ή 29 (K-29) αποτελεί τροποποίηση που στοχεύει πρωτεΐνες για αποικοδόμηση στο

πρωτεάσωμα (Baboshina και Haas, 1996; Johnson et al., 1995; Xu et al., 2009). Τέλος, πρόσφατα έχει βρεθεί ένας νέος τύπος αλυσίδας ουβικιτίνης, στον οποίο το καρβοξυτελικό άκρο της ουβικιτίνης συνδέεται με την α-αμινομάδα του αμινοτελικού άκρου της μεθειονίνης ενός επιπλέον μορίου ουβικιτίνης δημιουργώντας μια γραμμική αλυσίδα πολυουβικιτίνης (Kirisako et al., 2006). Αυτού του τύπου η αλυσίδα ουβικιτίνης δείχθηκε πως ενεργοποιεί το μονοπάτι NF-κΒ (Behrends και Harper, 2011; Iwai και Tokunaga, 2009).

1.2.3. Η ανακύκλωση της ουβικιτίνης

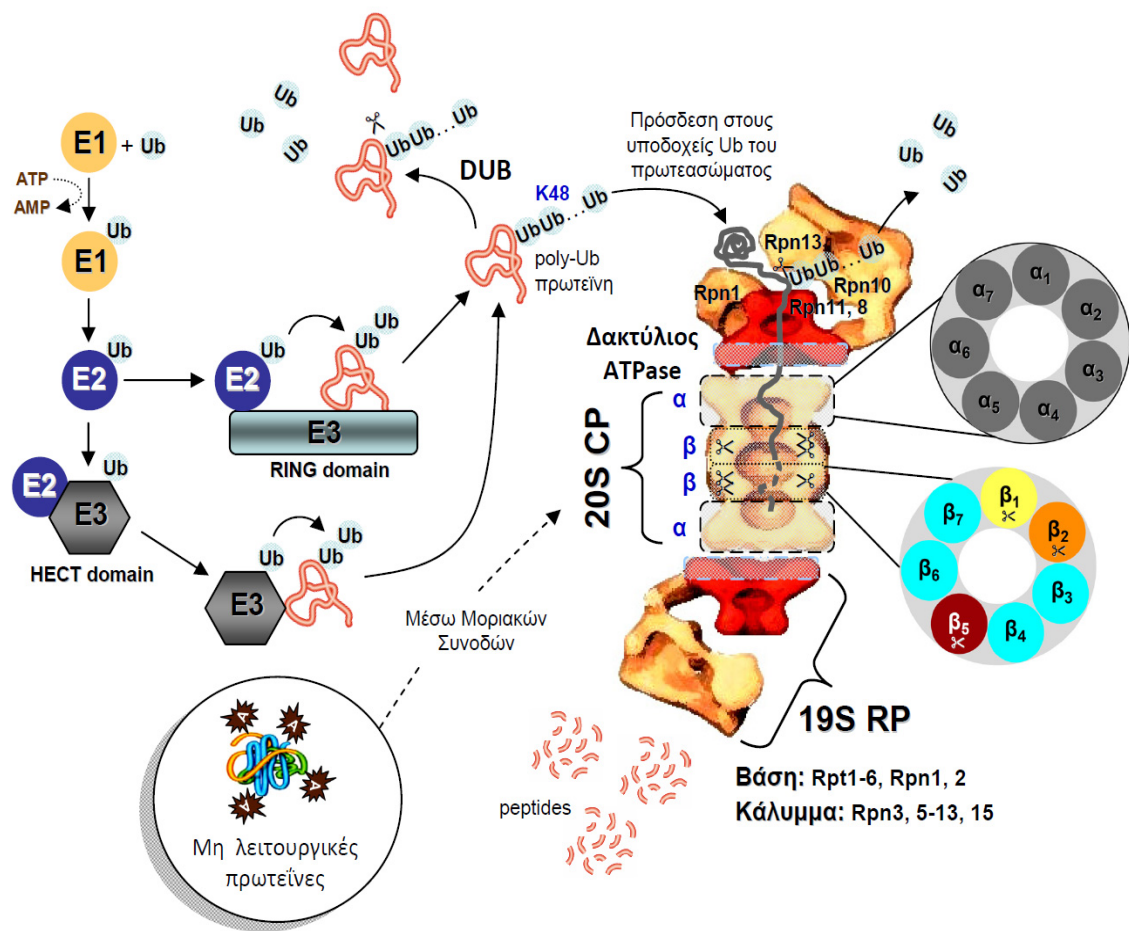
Η απελευθέρωση της ουβικιτίνης είναι πολύ σημαντική τόσο για την πρωτεϊνική αποικοδόμηση όσο και για τη σύνθεση της ουβικιτίνης. Ειδικά ένζυμα απο-ουβικιτινώσης (Deubiquitinating enzymes-DUBs) συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία, καθώς υδρολύουν αμίδια και εστέρες στο καρβοξυτελικό άκρο της ουβικιτίνης. Μερικά DUBs απελευθερώνουν την ουβικιτίνη πριν την αναγνώριση από το πρωτεάσωμα με αποτέλεσμα την αναστολή της αποικοδόμησης. Ένας ακόμη ρόλος των DUBs είναι να ρυθμίζουν τα επίπεδα της ελεύθερης ουβικιτίνης και της συζευγμένης μορφής της (Nijman et al., 2005; Shabek et al., 2007). Τα ένζυμα DUBs χωρίζονται σε πέντε μεγάλες οικογένειες, οι οποίες ανάλογα με τη λειτουργία τους είναι οι εξής: οι πρωτεάσες Usp (Ub-specific protease), οι υδρολάσες UCH (Ubcboxyl-terminal hydrolases), οι πρωτεάσες OTU (ovarian tumour-like proteases), οι μεταλλοπρωτεάσες JAMM/MPN και οι πρωτεάσες Machado-Jakob-disease (Nijman et al., 2005).

1.3 Το πρωτεάσωμα

Το πρωτεάσωμα είναι ένα μεγαλοπρωτεϊνικό σύμπλοκο με μέγεθος ~2,5 MDa, το οποίο παίζει κύριο ρόλο στην κυτταρική ομοιοστασία και την πρωτεϊνική αποικοδόμηση, από τα αρχαιοβακτήρια μέχρι τα ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα. Το 26S πρωτεάσωμα αποτελείται από το 20S καταλυτικό κέντρο (Core Particle-CP) και από ένα ή δύο 19S ρυθμιστικά μόρια (Regulatory Particle-RP), τα οποία προσδένονται στα άκρα του 20S καταλυτικού κέντρου (Saeki και Tanaka, 2012) (Εικ.1.2). Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, οι ουβικιτινωμένες πρωτεΐνες με μικρό χρόνο ημιζωής αποικοδομούνται από το 26S πρωτεάσωμα (Ciechanover et al., 2000; Pickart, 2000), ενώ οι μη λειτουργικές ή οξειδωμένες πρωτεΐνες αποικοδομούνται από το 20S πρωτεάσωμα (Davies, 2001; Grune et al., 2003).

1.3.1 Το 20S καταλυτικό κέντρο (CP): δομή, λειτουργία και αυτοσυγκρότηση

Το 20S CP, στα ευκαρυωτικά κύτταρα, αποτελείται από 28 α- και β-τύπου υπομονάδες που ομαδοποιούνται ανά επτά (7) σε 4 δακτυλίους (Jung et al., 2009; Maupin-Furlow, 2013). Οι εσωτερικοί δακτύλιοι αποτελούνται από τις β-τύπου υπομονάδες (β1-7) και οι εξωτερικοί δακτύλιοι από τις α-τύπου υπομονάδες (α1-7).



Εικόνα 1.2 Τα δομικά συστατικά του συστήματος ουβικιτίνης-πρωτεασώματος (Ubiquitin-Proteasome System-UPS). Το UPS αποτελείται από το ένζυμο ενεργοποίησης της ουβικιτίνης (Ubiquitin-ουβικιτίνη) E1, το οποίο μεταφέρει την ουβικιτίνη στην καταλυτική θέση του ενζύμου σύζευξης της ουβικιτίνης E2. Τελικά, η λιγάση της ουβικιτίνης, E3 (που μπορεί να είναι είτε τύπου HECT είτε τύπου RING domain) συνδέει την ουβικιτίνη με ένα εσωτερικό κατάλοιπο λυσίνης (Lys) στην πρωτεΐνη στόχο. Οι λιγάσες επικράτειας HECT domain συνδέονται με την ενεργοποιημένη ουβικιτίνη και δημιουργούν ένα ισοπεπτιδικό δεσμό ανάμεσα στην ουβικιτίνη και το υπόστρωμα (πρωτεΐνη στόχο), ενώ οι λιγάσες RING δρουν ως «ικρίωμα», καθώς φέρνουν κοντά το ένζυμο E2 (που φέρει την ουβικιτίνη) και το υπόστρωμα-στόχο. Η πολυουβικιτινωμένη πρωτεΐνη (όπου συνήθως τα μόρια ουβικιτίνης έχουν συνδεθεί μεταξύ τους στα κατάλοιπα λυσίνης 48) μπορεί να αναγνωριστεί από το πρωτεάσωμα και τελικά να αποικοδομηθεί. Το 26S πρωτεάσωμα αποτελείται από το καταλυτικό κέντρο 20S (core particle-CP) και από ένα ή δύο ρυθμιστικά μόρια 19S (regulatory particles-RP), τα οποία προσδένονται στα άκρα του• το 19S RP περιέχει ~20 υπομονάδες και η λειτουργία του εξαρτάται από ATP και από την ουβικιτίνη. Το 19S RP οργανώνεται σε δύο υποσύμπλοκα, γνωστά ως βάση (όπου εντοπίζεται και ο δακτύλιος των ATPασών) και κάλυμμα. Τα πολυουβικιτινωμένα υποστρώματα αναγνωρίζονται από τις υπομονάδες του 19S πρωτεασώματος (Rpn1 και Rpn13) που φέρουν μοτίβα αναγνώρισης της ουβικιτίνης. Στη συνέχεια, ακολουθεί η απελευθέρωση της ουβικιτίνης και η πρωτεΐνη που πρόκειται να αποικοδομηθεί εισέρχεται στο 20S CP, όπου και πρωτεολύεται. Το 20S καταλυτικό κέντρο (στα ευκαρυωτικά κύτταρα) αποτελείται από 28 υπομονάδες, α- και β-τύπου, που δημιουργούν τέσσερις δακτυλίους. Οι τρεις ενζυματικές ενεργότητες του πρωτεασώματος εντοπίζονται στις υπομονάδες β1, β2 και β5. Πέρα από την αποικοδόμηση των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών, το 20S πρωτεάσωμα φαίνεται να αποικοδομεί με τη διαμεσολάβηση μοριακών συνοδών και μη σωστά διπλωμένες, οξειδωμένες ή μη λειτουργικές πρωτεΐνες (πηγή : Tsakiri και Trougakos, υπό υποβολή).

Το 20S CP έχει κυλινδρικό σχήμα με οργάνωση των δακτυλίων : α-β-β-α. Επίσης, φέρει μια οπή στη μέση, όπου εισέρχονται οι πρωτεΐνες προς αποικοδόμηση και φέρει τρεις ενεργότητες πεπτιδάσης (Groll et al., 1997). Συγκεκριμένα, οι ενζυματικές πρωτεασωμικές ενεργότητες εντοπίζονται στις β1, β2 και β5 υπομονάδες και έχουν ενεργότητα κασπάσης, θρυψίνης και χυμοθρυψίνης, αντίστοιχα (Dick et al., 1998; Groll και Clausen, 2003) (Εικ. 1.2). Η ενζυμική ενεργότητα χυμοθρυψίνης διασπά μετά από υδροφοβικά κατάλοιπα, η ενζυμική ενεργότητα κασπάσης μετά από όξινα κατάλοιπα, ενώ η ενεργότητα θρυψίνης μετά από βασικά κατάλοιπα (Arendt και Hochstrasser, 1997). Οι α-τύπου υπομονάδες δεν διαθέτουν ενζυμική ενεργότητα (Groll και Clausen, 2003) και θεωρείται ότι έχουν ρυθμιστικό ρόλο, καθώς τα αμινο-τελικά άκρα τους σχηματίζουν την «πύλη» του 20S πρωτεασώματος, η οποία ρυθμίζει την είσοδο των υποστρωμάτων στους β-δακτυλίους (Kunjappu και Hochstrasser, 2013).

Η αυτο-συγκρότηση του 20S CP πραγματοποιείται με τη βοήθεια μοριακών συνοδών, καθώς και με τη σταδιακή ωρίμανση των β υπομονάδων (Kunjappu και Hochstrasser, 2013). Το πρώτο στάδιο για τη συγκρότηση του πρωτεασώματος είναι ο σχηματισμός των α-δακτυλίων. Αν και θα πρέπει να σημειωθεί, ότι σε πολλά αρχαιοβακτήρια και κάποια ευκαρυωτικά κύτταρα, ο σχηματισμός του α-δακτυλίου γίνεται αυθόρμητα (Gerards et al., 1997; Gerards et al., 1998; Nagy et al., 1998; Pouch et al., 2000), στους περισσότερους οργανισμούς το στάδιο αυτό προαπαιτεί τη συμμετοχή μοριακών συνοδών (Hirano et al., 2005; Hirano et al., 2006; Kusmierczyk et al., 2011; Sasaki et al., 2010; Stadtmueller et al., 2012). Δυο ετεροδιμερή μοριακών συνοδών, γνωστά ως Pba1/Pba2 (στον άνθρωπο PAC1/PAC2) και Pba3/Pba4 (στον άνθρωπο PAC3/PAC4), έχειδειχθεί ότι προωθούν το σχηματισμό του α-δακτυλίου (Hirano et al., 2005; Hirano et al., 2006; L et al., 2007). Μελέτη σε ανθρώπινα κύτταρα έδειξε ότι το σύμπλοκο PAC1/PAC2 προσδένεται στις α5 και α7 υπομονάδες ελέγχοντας έτσι το σωστό σχηματισμό του α-δακτυλίου (Hirano et al., 2005). Πρόσφατα, δείχθηκε ότι το σύμπλοκο Pba1/Pba2 διαθέτει στο καρβοξυ-τελικό άκρο το μοτίβο HbYX (hydrophobic-tyrosine-any amino acid), το οποίο αλληλεπιδρά με συγκεκριμένες λυσίνες στη δομή «τσέπης» (pocket) που σχηματίζουν οι α- υπομονάδες (Stadtmueller et al., 2012). Επίσης, η καταστολή της έκφρασης του συμπλόκου Pba1/Pba2 οδήγησε σε ανώμαλο σχηματισμό του α-δακτυλίου, ενώ η μείωση της έκφρασης της μοριακής συνοδού Pba1 στα ποντίκια προκάλεσε αυξημένη θνησιμότητα (Hirano et al., 2005; Sasaki et al., 2010). Από την άλλη πλευρά, ο κύριος ρόλος του συμπλόκου Pba3/Pba4 φαίνεται να είναι η επιδιόρθωση σε πιθανή ύπαρξη μη σωστής αλληλεπίδρασης των α- υπομονάδων (Yashiroda et al., 2008). Έχει βρεθεί ότι το σύμπλοκο Pba3/Pba4 ελέγχει την πρόσβαση της α3 υπομονάδας στον α-δακτύλιο, καθώς η έλλειψη αυτού του συμπλόκου οδήγησε στην αντικατάσταση της α3 υπομονάδας από την α4, δηλαδή δημιουργήθηκε α-δακτύλιος χωρίς την ύπαρξη α3 υπομονάδας (Kusmierczyk et al., 2008)• εύρημα το οποίο

επίσης παρατηρήθηκε μετά από έλλειψη της $\alpha 3$ υπομονάδας (Velichutina et al., 2004). Αφού ολοκληρωθεί ο σχηματισμός του α -δακτύλιου, η πρωτεΐνη Ump1 (στον άνθρωπο POMP1) προωθεί την απομάκρυνση του συμπλόκου Pba3/Pba4 και τη συγκρότηση του β -δακτύλιου πάνω στον α -δακτύλιο (Ramos et al., 1998; Hirano et al., 2005; Hirano et al., 2006; Yashiroda et al., 2008).

Στα θηλαστικά, ο σχηματισμός του β -δακτύλιου ξεκινά με την προσθήκη πρώτα της $\beta 2$ υπομονάδας. Τα αμινο-τελικά προπεπτίδια, καθώς και τα καρβοξυ-τελικά άκρα των β -υπομονάδων (εκτός από τη $\beta 1$ και $\beta 7$) προωθούν τη σωστή είσοδό τους στο δακτύλιο (Hirano et al., 2008). Το προπεπτίδιο της $\beta 5$ υπομονάδας πέρα από το ρόλο του στη συγκρότηση του δακτύλιου φαίνεται επίσης να έχει ενεργότητα μοριακής συνοδού, (Chen και Hochstrasser, 1996; Ramos et al., 1998). Επιπλέον, κάθε β -υπομονάδα έχει μια μοναδική αλληλουχία που επιτρέπει την αλληλεπίδρασή της με τη γειτονική της υπομονάδα δημιουργώντας ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις (Groll et al., 1997). Για παράδειγμα, το καρβοξυ-τελικό άκρο της $\beta 2$ υπομονάδας αλληλεπιδρά με τη $\beta 3$ υπομονάδα δημιουργώντας δομή αντιπαράλληλου β -πτυχωτού φύλλου, το οποίο αρχικά αλληλεπιδρά με τη $\beta 4$ υπομονάδα και στη συνέχεια με τη $\beta 6$ και τη $\beta 7$ υπομονάδα από τον παρακείμενο β -δακτύλιο (Ramos et al., 1998; Gallastegui και Groll, 2010). Οι $\beta 1$ και $\beta 7$ υπομονάδες είναι οι τελευταίες που ενσωματώνονται στον ημιτελή β -δακτύλιο (Nandi et al., 1997; Griffin et al., 1998; Hirano et al., 2008). Το καρβοξυ-τελικό άκρο της $\beta 7$ υπομονάδας, καθώς και οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις του β -δακτύλιου διαμεσολαβούν τη σωστή σύνδεση των δυο μισών πρωτεασωμάτων, δηλαδή τη σύνδεση α - β με β - α , για να δημιουργηθεί η τελική δομή του α - β - β - α (20S) πρωτεασώματος (Gallastegui και Groll, 2010).

Τελικά, η συγκρότηση του 20S CP ολοκληρώνεται με την autolysis των προπεπτιδίων των β -υπομονάδων και την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης Ump1 και του συμπλόκου Pba1/Pba2 από το ενεργοποιημένο πλέον 20S CP (Ditzel et al., 1998; Ramos et al., 1998; Hirano et al., 2005). Η πύλη του 20S CP παραμένει κλειστή από τα αμινο-τελικά άκρα των α -υπομονάδων και ανοίγει με την πρόσδεση του 19S ρυθμιστικού πρωτεασώματος (Groll et al., 2000; Whitby et al., 2000).

1.3.2. Το 19S ρυθμιστικό σύμπλοκο (RP): δομή, λειτουργία και συγκρότηση

Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας χαμηλής ανάλυσης από απομονωμένα πρωτεασώματα έδειξαν ότι το 19S ρυθμιστικό σύμπλοκο (19SRP ή PA700) περιέχει 20 υπομονάδες, οι οποίες είναι εξελικτικά συντηρημένες και οργανώνονται σε δύο υποσύμπλοκα, που ονομάζονται βάση και κάλυμμα (Peters et al., 1991; Ikai et al., 1991; Glickman et al., 1998b; Walz et al., 1998; Nickell et al., 2007; Da Fonseca και Morris, 2008). Η βάση αποτελείται από έξι υπομονάδες με δράση ATPσης τύπου AAA (Rpt 1-6) και δύο

μεγάλες ρυθμιστικές υπομονάδες τις Rpn1 και Rpn2 (Glickman et al., 1998a; Walz et al., 1998). Κάθε ATPase εμπλέκεται σε ξεχωριστή λειτουργία κατά την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών (Rubin et al., 1998; Smith et al., 2007) ενώ οι δυο ρυθμιστικές υπομονάδες, Rpn1-2 διαθέτουν το μοτίβο Arm/HEAT που σχηματίζει α-έλικες (Glickman et al., 1998b; Kajava, 2002). Έχει βρεθεί ότι η Rpn2 υπομονάδα μπορεί να προσδεθεί κατευθείαν στον α-δακτύλιο του 20S CP (Rosenzweig et al., 2008). Το κάλυμμα περιέχει εννιά υπομονάδες (Rpn3, Rpn5-13 και Rpn15) με μοναδική αλληλουχία, δομή και λειτουργία (Glickman et al., 1998a; Walz et al., 1998; Tomko και Hochstrasser, 2011). Συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι η Rpn13 υπομονάδα και, πιθανόν, η Rpn1 υπομονάδα λειτουργούν ως υποδοχείς της ουβικιτίνης, ενώ η βάση και το κάλυμμα φαίνεται να συνδέονται μέσω της Rpn10 υπομονάδας σχηματίζοντας έτσι το 19S RP (Glickman et al., 1998a). Οι υπομονάδες Rpn3, Rpn5-7, Rpn9 και Rpn12 δημιουργούν το μοτίβο Proteasome-CSN-Initiation factor 3 (PCI) εκθέτοντας το καρβοξυτελικό άκρο σε αναδίπλωση έλικας το οποίο πλαισιώνεται από ένα ελικοειδές τμήμα. Οι υπομονάδες Rpn8 και Rpn11 διαθέτουν στο αμινο-τελικό τους άκρο το μοτίβο Mpr1-Pad1 N-terminal (MPN). Το μοτίβο MPN της Rpn11 υπομονάδας (και πιθανόν αυτό της Rpn8) έχει ενεργότητα απο-ουβικτινίωσης (Lkaiser et al., 2012; Maytal-Kivity et al., 2002).

Η συγκρότηση του 19S RP δεν είναι πλήρως κατανοητή. Θεωρείται ότι η συγκρότηση του καλύματος ακολουθεί τρία στάδια που περιλαμβάνουν το σχηματισμό ενός συμπλόκου από τις υπομονάδες Rpn5, 6, 8, 9 και 11, το οποίο προσδένεται σε ένα άλλο σύμπλοκο από τις υπομονάδες Rpn3, 7 και 15 ενώ τέλικά προστίθεται η υπομονάδα Rpn12 (Fukunaga et al., 2010). Όσον αφορά στη συγκρότηση της βάσης (ATPase/Rpt) πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι στο σχηματισμό του δακτυλίου ATPase/Rpt συμμετέχουν οι μοριακοί συνοδοί Nas2, Nas6, Hsm3 και Rpn15. Οι παραπάνω μοριακοί συνοδοί είναι συντηρημένοι από το ζυμομύκητα μέχρι τον άνθρωπο και έχουν μια πληθώρα από μοτίβα αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών όπως το μοτίβο PDZ (Nas2), καθώς και οι επαναλήψεις ARM/HEAT (Hsm3), WD40 (Rpn14) και ανκυρίνης (Nas6) (Funakoshi et al., 2009; L et al., 2009; Roelofs et al., 2009; Saeki et al., 2009). Η λειτουργία και των τεσσάρων μοριακών συνοδών είναι μάλλον συμπληρωματική, καθώς η έλλειψη εκάστου των γονιδίων τους εμφανίζει ήπια επίδραση (Funakoshi et al., 2009). Πρόσφατα, προτάθηκε ένα μοντέλο, σύμφωνα με το οποίο κάθε μοριακή συνοδός αλληλεπιδρά με μία ή δύο Rpt υπομονάδες. Συγκεκριμένα, η Nas2 αλληλεπιδρά με τις υπομονάδες Rpt4-Rpt5, η Nas6 δένεται με την Rpt3, η Hsm3 αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο Rpt1-Rpt2 το οποίο συνδέεται με την Rpn1 υπομονάδα και τέλος, η Rpn14 προσδένει την Rpt6 υπομονάδα (Rosenzweig et al., 2008; Funakoshi et al., 2009). Τα παραπάνω σύμπλοκα σχηματίζουν τον Rpt-δακτύλιο, ο οποίος φαίνεται πως αλληλεπιδρά πρώτα με τις υπομονάδες Rpn2, Rpn13 και Rpn10 και στη συνέχεια με το συγκροτημένο κάλυμμα.

Η βάση του 19S RP αλληλεπιδρά με τον α-δακτύλιο του 20S CP με τον εξής τρόπο. Οι καρβοξυ-τελικές ουρές των Rpt υπομονάδων εισέρχονται στη δομή «τσέπης» που σχηματίζουν οι α-υπομονάδες. Η καρβοξυ-τελική ουρά της Rpt6 υπομονάδας φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην παραπάνω σύνδεση, γιατί δρα σαν άγκυρα για τη σύνδεση της βάσης με το 20S CP (Park et al., 2013). Σύμφωνα με μια άλλη μελέτη, οι υπομονάδες Rpn1 και Rpn2 αλληλεπιδρούν πρώτα με το 20S CP (Rosensweig et al., 2008). Τέλος, ο παράγοντας Ecm29, ο οποίος εντοπίζεται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα (Gorbea et al., 2004; Kajava et al., 2004), φαίνεται να συμμετέχει τόσο στην ομαλή συγκρότηση του 26S πρωτεασώματος, όσο και στην επιδιόρθωση μη σωστά αυτοσυγκροτημένων πρωτεασωμάτων (Wang et al., 2010; Lehmann et al., 2010; Lee et al., 2011; Park et al., 2011).

1.3.3. Εναλλακτικές μορφές πρωτεασώματος

Το ρυθμιστικό σύμπλοκο PA28 (ή 11S) είναι ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που αλληλεπιδρά με το 20S πρωτεάσωμα, προκειμένου να σχηματιστεί το ανοσοπρωτεάσωμα (Kimura et al., 2009; Rock και Goldberg, 1999), το οποίο εμπλέκεται στην αντιογονοπαρουσίαση (Barton et al., 2002). Κατά το σχηματισμό του ανοσοπρωτεασώματος, οι τρεις υπομονάδες β1, β2 και β5 (που φέρουν ενεργότητα πεπτιδάσης) αντικαθίστανται από τρεις ανοσο-υπομονάδες β1i, β2i και β5i, των οποίων η έκφραση επάγεται κύρια από την πρωτεΐνη ιντερφερόνη-γ (Interferon-γ, IFN-γ) (Nandi et al., 1997; Griffin et al., 1998; Kloetzel και Ossendorp, 2004; Kimura et al., 2009). Τα ανοσοπρωτεασώματα έχουν βρεθεί σε κύτταρα και ιστούς του ανοσοποιητικού συστήματος των θηλαστικών.

Τα επιθηλιακά κύτταρα του φλοιού του θύμου αδένος διαθέτουν τα θυμοπρωτεασώματα, μια μορφή πρωτεασώματος που περιέχει την ειδική για τα σπονδυλωτά καταλυτική υπομονάδα β5t. Τα θυμοπρωτεασώματα διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στην ανάπτυξη των CD8 T κυττάρων και την υποστήριξη θετικής επιλογής των T-κυτταρικών κλώνων (Takahama et al., 2012; Xing et al., 2013). Μία άλλη μορφή του πρωτεασώματος έχει βρεθεί στη *Drosophila* και αφορά στο ιστοειδικό πρωτεάσωμα που εκφράζεται στο αναπαραγωγικό σύστημα των αρσενικών κατά τη σπερματογένεση. Στο πρωτεάσωμα αυτό, η α6 πρωτεασωμική υπομονάδα αντικαθίσταται από την υπομονάδα Prosalpha6T (Belote et al., 1998; Zhong και Belote, 2007).

Τέλος, έχειδειχθεί ότι η πρωτεΐνη Blm10 (ή PA200) προσδένεται στο 20S CP και προωθεί την ενεργοποίησή του με έναν ATP-ανεξάρτητο τρόπο, χωρίς να είναι γνωστός ο μοριακός μηχανισμός αυτής της ενεργοποίησης (Ustrell et al., 2002; Khor et al., 2006; Dange et al., 2011; Lopez et al., 2011).

1.3.4. Ενδοκυτταρική εντόπιση και ρύθμιση του πρωτεασώματος

Τα πρωτεασώματα βρίσκονται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτοσόλιο, ενώ έχει αναφερθεί ότι μπορεί να εντοπιστούν και εξωκυτάρια σε κάποιες παθολογικές καταστάσεις (όπως π.χ. στον καρκίνο) (Lavabre-Bertrand et al., 2001; De Martino et al., 2012) (Εικ. 1.2). Αρκετές (αλλά όχι όλες) πρωτεασωμικές υπομονάδες διαθέτουν σήμα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization sequence -NLS) (Tanaka et al., 1990; Nederlof et al., 1995), υποδηλώνοντας ότι κάποια στάδια αυτοσυγκρότησης του πρωτεασώματος μπορούν να γίνουν επίσης και στον πυρήνα. Όσον αφορά στα πυρηνικά πρωτεασώματα τα πρώτα στάδια της συγκρότησης του 20S CP φαίνεται να συμβαίνουν στο κυτοσόλιο καθώς οι μοριακοί συνοδοί που εμπλέκονται στο σχηματισμό του α -δακτυλίου συγκεντρώνονται κυρίως στο κυτοσόλιο (Huh et al., 2003). Αντίθετα τα τελικά στάδια της αυτοσυγκρότησης πιθανόν να συμβαίνουν στον πυρήνα καθώς η πρωτεΐνη Ump1 βρίσκεται στον πυρήνα (Lehmann et al., 2002).

Στον ζακχαρομύκητα, τα ενδογενή (ή ως αποτέλεσμα απόκρισης στο στρες) επίπεδα έκφρασης του πρωτεασώματος φαίνεται να ρυθμίζονται από τον μεταγραφικό παράγοντα Rpn4, ο οποίος προσδένεται στην αλληλουχία PACE (proteasome-associated control element) που βρίσκεται στον υποκινητή των πρωτεασωμικών γονιδίων. Ο μεταγραφικός παράγοντας Rpn4 φαίνεται επίσης να ρυθμίζει πληθώρα γονιδίων, τα οποία συμμετέχουν σε κυτταρικές διεργασίες αλλά πιθανότατα δεν ρυθμίζει την έκφραση των μοριακών συνοδών που συμμετέχουν στην αυτοσυγκρότηση του πρωτεασώματος (Mannhaupt et al., 1999; Xie και Varshavsky, 2001). Επίσης, ενδιαφέρον παρουσιάζει το εύρημα ότι η ρύθμιση του Rpn4 εξαρτάται από την ενεργότητα του πρωτεασώματος (Xie και Varshavsky, 2001; Ju και Xie, 2004).

Η ρύθμιση του πρωτεασώματος στα ανώτερα μετάζωα δεν είναι γνωστή. Σύμφωνα με *in vitro* μελέτες, οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-E2-related factor-1 (Nrf1) και NF-E2-related factor-2 (Nrf2) φαίνεται να εμπλέκονται στη ρύθμιση των πρωτεασωμικών γονιδίων παρουσία στρες (Kwak et al., 2003; Radhakrishnan et al., 2010; Steffen et al., 2010). Οι μεταγραφικοί παράγοντες Nrf1 και Nrf2 ανήκουν στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων cap “n” collar-basic leucine zipper, οι οποίοι, παρουσία στρες, ενεργοποιούνται, εισέρχονται στον πυρήνα και αφού δημιουργήσουν διμερή με την πρωτεΐνη Maf (musculo aponeurotic fibrosarcoma) προσδένονται στα στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης (AREs-antioxidant response elements), προκειμένου να επάγουν την έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων (Biswas και Chan, 2010; Sykiotis και Bohmann, 2008). Έχει προταθεί ότι στοιχεία AREs εντοπίζονται και στους υποκινητές των πρωτεασωμικών γονιδίων. Πρόσφατες, *in vitro* μελέτες σε κύτταρα θηλαστικών έδειξαν ότι ο Nrf1 συμμετέχει στη ρύθμιση των πρωτεασωμικών γονιδίων, καθώς προσδένεται στο στοιχείο ARE του υποκινητή τους μετά από μερική αναστολή του πρωτεασώματος (Radhakrishnan et al., 2010; Steffen et al., 2010).

Επιπλέον, *in vitro* μελέτες σε κύτταρα από το έντομο *Drosophila*, αλλά και σε ανθρώπινους ινοβλάστες υπέδειξαν τον Nrf2 ως υπονήφιο ρυθμιστή των πρωτεασωμικών γονιδίων (Kapeta et al., 2010; Grimberg et al., 2011). Συγκεκριμένα, μετά από έκθεση κυττάρων στην ουσία sulforaphane, ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 φαίνεται να προσδένεται στο ARE του β5 πρωτεασωμικού γονιδίου και να επάγει την έκφρασή του (Kwak et al., 2003). Τέλος, σε μια πρόσφατη *in vitro* μελέτη δείχθηκε ότι ο μεταγραφικός παράγοντας NF-Y πιθανόν να εμπλέκεται στη ρύθμιση των ενδογενών (όσο και αυτών μετά από στρες) επιπέδων έκφρασης των πρωτεασωμικών γονιδίων στον άνθρωπο προσδεδεμένος στην αλληλουχία CCAAT box του υποκινητή των πρωτεασωμικών γονιδίων (Xu et al., 2012).

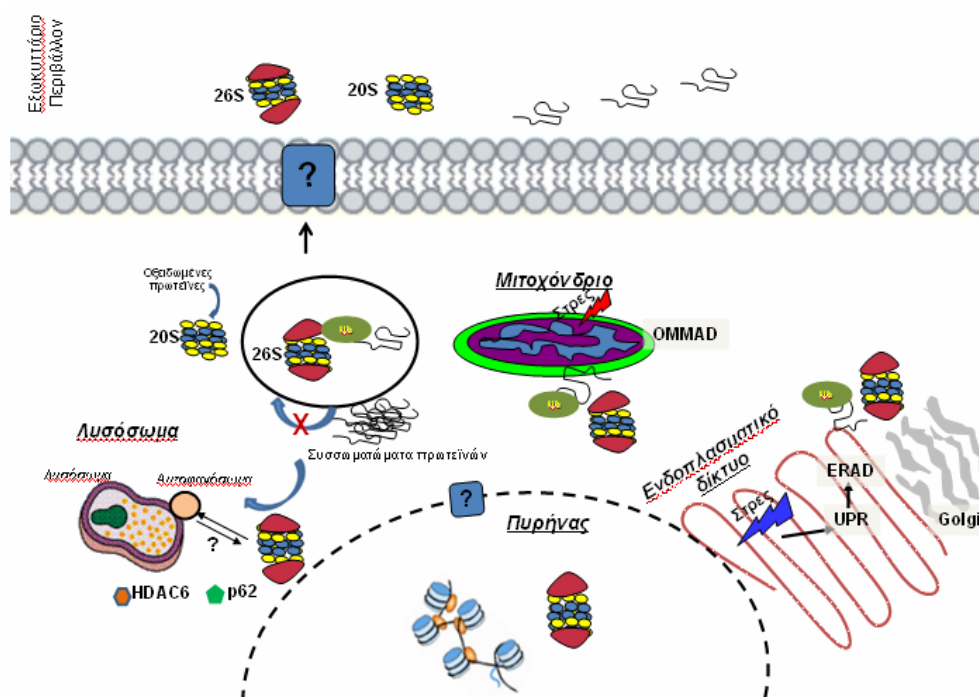
Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ρύθμιση του πρωτεασώματος φαίνεται να είναι ιστοειδική. Συγκεκριμένα, πολύ πρόσφατα (και ενώ η παρούσα Διατριβή ήταν σε εξέλιξη) δείχθηκε πως η γονιδιακή έκφραση και ενεργότητα του πρωτεασώματος ρυθμίζεται διαφορετικά στις ωοθήκες και τους σωματικούς ιστούς στη *Drosophila* (Fredriksson et al., 2012). Σε συμφωνία με τα παραπάνω, η ενεργότητα του πρωτεασώματος φαίνεται να είναι σε υψηλότερα επίπεδα στα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα. Το εύρημα αυτό συσχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεασωμικής υπομονάδας Rpn6 (Vilchez et al., 2012b).

Επιπλέον, η ρύθμιση του πρωτεασώματος φαίνεται να παρουσιάζει διαφορές τόσο ανάμεσα σε διαφορετικά είδη όσο και από άτομο σε άτομο. Ειδικότερα, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η ενεργότητα του πρωτεασώματος σε ξεχωριστά άτομα *Drosophila* εμφανίζει σημαντικές διαφορές (Hansen et al., 2012), ενώ διαφορετικά είδη τρωκτικών παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στην ενεργότητα του πρωτεασώματος (Rodriguez et al., 2012).

Η λειτουργία του πρωτεασώματος ρυθμίζεται επίσης από σειρά μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (post-translational modifications; PTMs) (Bose et al., 2004; Zong et al., 2008; Kikuchi et al., 2010; Scruggs et al., 2012). Συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι αρκετές πρωτεασωμικές υπομονάδες (όπως οι α2-α4, α7, Rpt2 και Rpt6) φωσφορυλιώνονται *in vivo* (Mason et al., 1996; Feng et al., 2001; Iwafune et al., 2002; Iwafune et al., 2004). Το πρωτεάσωμα περιέχει τουλάχιστον 88 θέσεις φωσφορυλίωσης και φαίνεται πως η φωσφορυλίωση γενικά συνδέεται με την ενεργοποίηση του 26S πρωτεασώματος (Kikuchi et al., 2010). Έχει προταθεί ότι η φωσφορυλίωση της α7 υπομονάδας συμβάλλει στη μείωση της ενεργότητας του πρωτεασώματος (Day et al., 2013), ενώ η φωσφορυλίωση του ηπατικού 20S CP σε ηπατική νόσο συσχετίστηκε με τη δυσλειτουργία του πρωτεασώματος (Bardag-Gorce et al., 2004). Τα πρωτεάσωματα μπορούν επίσης να τροποποιηθούν από μετα-μεταφραστική τροποποίηση O-linked N-acetylglucosamine. Η τροποποίηση αυτή εμπλέκεται συνήθως στη σηματοδότηση μεταβολικών μονοπατιών, τη μεταγραφή, καθώς και στις λειτουργίες του κυτταροσκελετού (Bowe et al., 2006). Έχειδειχθεί ότι, όταν η υπομονάδα Rpt2 τροποποιήθηκε από O-linked N-acetylglucosamine παρατηρήθηκε μείωση της ενεργότητας

του πρωτεασώματος (Zhang et al., 2003). Επιπλέον, οι υπομονάδες Rpt2 από πρωτεασώματα του καρδιακού ιστού φαίνεται να τροποποιούνται από N-μυριστοϋλίωση (Gomes et al., 2006). Αρκετές υπομονάδες του 19S (Rpn1, Rpn5, Rpn6, Rpt3 και Rpt6) και του 20S (α 2, α 5, α 7, β 3 και β 4) πρωτεασώματος τροποποιούνται επίσης με ακετυλίωση στο αμινο-τελικό άκρο χωρίς να είναι ξεκάθαρη η επίδραση της τροποποίησης αυτής στη λειτουργία του πρωτεασώματος (Gomes et al., 2006). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η υπομονάδα Rpn10 μονοουβικιτινιώνεται με αποτέλεσμα τη μείωση της ενεργότητας του πρωτεασώματος (Isasa et al., 2010). Τέλος, το πρωτεάσωμα υφίσταται τροποποίηση από τα προϊόντα της υπεροξειδωσής των λιπιδίων [γνωστά ως HNE (4-hydroxy-2-nonenal)], τα οποία μειώνουν την ενεργότητα του πρωτεασώματος κατά την καρδιακή ισχαιμία (Farout et al., 2006).

Συμπερασματικά, η ρύθμιση του πρωτεασώματος είναι μια πολύπλοκη διαδικασία με πολλά και διάφορα επίπεδα ρύθμισης που σίγουρα χρειάζεται περαιτέρω μελέτη για τη διαλεύκανσή της.



Εικόνα 1.2 Τοπολογία του UPS. Το UPS έχει μια ευρεία κατανομή, καθώς πέρα από το κυτοσόλιο, εντοπίζεται και στον πυρήνα. Επίσης, εντοπίζεται κοντά στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), καθώς συμμετέχει στην αποικοδόμηση των μη λειτουργικών πρωτεϊνών μετά από στρες στο ER• η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως ERAD (Endoplasmic Reticulum associated degradation). Επίσης, πρωτεασώματα εντοπίζονται στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και συμμετέχουν στην αποικοδόμηση μη λειτουργικών μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Έχει αναφερθεί ότι σε κάποιες παθολογικές καταστάσεις πρωτεασώματα εντοπίστηκαν και εξωκυττάρια στα βιολογικά υγρά. Ακόμη, το UPS συνδέεται με το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος χωρίς να είναι ξεκάθαρη αυτή η διαδικασία, αν και φαίνεται πως εμπλέκονται οι πρωτεΐνες HDAC2 και p62. Οι μηχανισμοί μεταφοράς πρωτεασώματος στον πυρήνα και τον εξωκυττάριο χώρο παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι (πηγή: Tsakiri και Trougakos, υπό υποβολή).

1.3.5 Λειτουργική επικοινωνία μεταξύ του μονοπατιού σηματοδότησης ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και των άλλων μονοπατιών σηματοδότησης που εμπλέκονται στη διατήρηση της πρωτεόστασης

1.3.5.1 Το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και τα άλλα πρωτεολυτικά συστήματα

Πέρα από το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος, ενεργό ρόλο στη διατήρηση της πρωτεόστασης έχει και το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος (Εικ. 1.2). Το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος εμπλέκεται στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών με μεγάλο χρόνο ζωής, πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και μη λειτουργικών κυτταρικών οργανιδίων. Τα τρία συστήματα αυτοφαγίας αφορούν στη μικροαυτοφαγία, τη μακροαυτοφαγία και τη αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη μέσω μοριακών συνοδών. Έχει δειχθεί ότι οι ουβικιτινωμένες πρωτεΐνες μπορούν να αποικοδομηθούν από την αυτοφαγία, κυρίως όταν το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος δυσλειτουργεί (Kirkin et al., 2009; Korolchuk et al., 2010; Karbowski και Youle, 2011; Richter-Lkaienberg και Leyk, 2013).

Η πρωτεΐνη HDAC6 (microtubule-associated histone deacetylase 6) φαίνεται να συμμετέχει σε αυτή τη διαδικασία, καθώς μετά από δυσλειτουργία του πρωτεασώματος (Richter-Lkaienberg και Leyk, 2013) και μέσω της επικράτειας αναγνώρισης της ουβικιτίνης που φέρει (BUZ finger domain) δένεται στις συσσωρευμένες ουβικιτινωμένες πρωτεΐνες και τις μεταφέρει για αποικοδόμηση μέσω της αυτοφαγίας (Kawaguchi et al., 2003) (Εικ. 1.2).

Άλλες δύο πρωτεΐνες, οι NBR1 και p62, φαίνεται πως αναγνωρίζουν ουβικιτινωμένες πρωτεΐνες μέσω της δομής υποδοχής της ουβικιτίνης που διαθέτουν και τις οδηγούν στην αυτοφαγία (Kirkin et al., 2009a,b; Lamark et al., 2009; Matsumoto et al., 2011) (Εικ. 1.2). Σχετικά πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η αυτοφαγία αναπληρώνει το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος όταν αυτό δυσλειτουργεί (Janen et al., 2010; Fusco et al., 2012), καθώς και ότι η αυτοφαγία ενεργοποιείται μετά από καταστολή της έκφρασης πρωτεασωμικών γονιδίων (Low et al., 2013). Ακόμη, έχει δειχθεί ότι η καταστολή του πρωτεασώματος στα τροφοκύτταρα της *Drosophila* οδήγησε σε ενεργοποίηση του προγραμματισμένου θάνατου μέσω αυτοφαγίας (Velentzas et al., 2011). Αντίθετα, η γενετική αναστολή της αυτοφαγίας φαίνεται να οδηγεί σε βλάβη του πρωτεασώματος (Korolchuk et al., 2009; Yeku και Figueiredo-Pereira, 2011), καθώς παρατηρήθηκε συσώρευση των πρωτεϊνών με μικρό και μεγάλο χρόνο ζωής, καθώς και των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, τα οποία επηρεάζουν τη λειτουργία του πρωτεασώματος (Korolchuk et al., 2009). Σε αντίθεση με τα παραπάνω, μία πρόσφατη μελέτη σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα έδειξε ότι η φαρμακολογική ή γενετική αναστολή της αυτοφαγίας επάγει την αύξηση της έκφρασης και ενεργότητας του πρωτεασώματος (Wang et al., 2013). Τέλος, μια άλλη λειτουργική σύνδεση

μεταξύ αυτοφαγίας και πρωτεασώματος αποτελεί το εύρημα ότι τα πρωτεασώματα αποικοδομούνται από το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος (Cuervo et al., 1995).

Το σύστημα των καλπαϊνών, καθώς και οι μιτοχονδριακές πρωτεάσες συμμετέχουν στη διατήρηση της πρωτεόστασης (Huang και Forsberg, 1998). Το σύστημα των καλπαϊνών αποτελείται από τις πρωτεάσες καλπαΐνη m και καλπαΐνη μ (η λειτουργία των οποίων εξαρτάται από το ασβέστιο και είναι οι πιο καλά χαρακτηρισμένες καλπαΐνες), καθώς και από την καλπαΐνη 10• τις ιστοειδικές καλπαΐνες, καθώς και τον αναστολέα calpastatin (Sorimachi et al., 1997; Goll et al., 2003).

Τα μιτοχόνδρια διαθέτουν το δικό τους πρωτεολυτικό σύστημα που αποτελείται από τις πρωτεάσες Lon και το πρωτεϊνικό σύμπλοκο ClpXP• και τα δύο αυτά συστήματα εντοπίζονται στη μήτρα του μιτοχονδρίου. Επίσης, οι πρωτεάσες AAA εντοπίζονται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και συμβάλλουν στην αποικοδόμηση μη λειτουργικών μιτοχονδριακών πρωτεϊνών (Arnold και Langer, 2002; Bakala et al., 2003; Matsushima και Kaguni, 2012). Αν και δεν είναι ξεκάθαρο, αν το σύστημα των καλπαϊνών και οι μιτοχονδριακές πρωτεάσες συνδέονται με το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος, πρόσφατα δείχθηκε πως βλάβη στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο μιτοχόνδριο οδήγησε σε μείωση της ενεργότητας του 26S πρωτεασώματος, αλλά όχι του 20S, μέσω της αποικοδόμησης της πρωτεασωμικής υπομονάδας Rpn10 από καλπαΐνες (Huang et al., 2013). Επιπλέον μελέτες έδειξαν πως το πρωτεάσωμα εμπλέκεται στην αποικοδόμηση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου και πιθανόν των πρωτεϊνών του διαμεμβρανικού χώρου (Margineantu et al., 2007; Taylor και Rutter, 2011) (Εικ. 1.2). Επίσης, αναστολή της ενεργότητας του πρωτεασώματος οδήγησε σε συσσώρευση των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών του μιτοχονδρίου (Sun et al., 2009). Αναλύσεις πρωτεωμικής απομονωμένων μιτοχονδρίων έδειξαν πως πάνω από 100 πρωτεΐνες του μιτοχονδρίου μπορούν να υποστούν ουβικιτινίωση (Jeon et al., 2007; Livnat-Levanon και Glickman, 2011; Peng et al., 2003), ενώ έχει δειχθεί πως αρκετές E3 λιγάσες [όπως οι MARCH και Parkin (Karbowsky et al., 2007; Nakamura et al., 2006; Yonashiro et al., 2006; Yoshii et al., 2011)] αλλά και ένζυμα απομάκρυνσης ουβικιτίνης, (Usp9x, Usp30, Usp36 και ataxin-3) (Nakamura και Hirose, 2008; Pozzi et al., 2008; Schwickart et al., 2010; Kim et al., 2011) σχετίζονται με τη μιτοχονδριακή λειτουργία.

1.3.5.2 Το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και το δίκτυο των μοριακών συνοδών

Στη διατήρηση της κυτταρικής πρωτεόστασης συμμετέχει επίσης ένα δίκτυο μοριακών συνοδών (molecular chaperones), το οποίο ελέγχει το σωστό δίπλωμα των πρωτεϊνών, την αναδίπλωση των μη σωστά διπλωμένων πρωτεϊνών (μη λειτουργικών πρωτεϊνών), ενώ παράλληλα παρεμποδίζει τη δημιουργία πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων. Οι πρωτεΐνες θερμικού στρες Hsp70 και Hsp90 [Heat shock protein 70 (Hsp70) και 90 (Hsp90)] είναι

μοριακοί συνοδοί και διαθέτουν στο καρβοξυ-τελικό τους άκρο το μοτίβο EEVD, το οποίο επιτρέπει τη σύνδεση άλλων μοριακών συνοδών (co-chaperones). Τα σύμπλοκα αυτά συμμετέχουν στην αποικοδόμηση των μη σωστά διπλωμένων πρωτεϊνών από το πρωτεάσωμα (Odunuga et al., 2003). Συγκεκριμένα, πρώτα η Hsp70 αναγνωρίζει μία μη σωστά διπλωμένη πρωτεΐνη και στη συνέχεια, ακολουθεί η πρόσδεση των μοριακών συνοδών HIP (Hsp70 interacting protein) και Hsp40, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ισχυρού δεσμού μεταξύ της Hsp70 και της μη σωστά διπλωμένης πρωτεΐνης (υπόστρωμα). Εάν το υπόστρωμα (πρωτεΐνη στόχος) μπορεί να διπλωθεί, τότε δημιουργείται το σύμπλοκο HOP (Hsp70-Hsp90 organizing protein), καθώς η μοριακή συνοδός Hsp40 και HIP αντικαθιστάται από την Hsp90 και δημιουργείται μια σύνδεση μεταξύ Hsp70-Hsp90 που οδηγεί στο σωστό δίπλωμα της πρωτεΐνης στόχου. Εάν το υπόστρωμα δε μπορεί να αναδιπλωθεί, τότε η HIP και η Hsp40 αντικαθίστανται από τις πρωτεΐνες BAG-1 (bcl-2 associated athanogene 1) και CHIP (Carboxyl terminus of Hsp70 interacting protein). Η CHIP είναι μια E3 λιγάση και ουβικιτινώνει τόσο το υπόστρωμα όσο και τις πρωτεΐνες BAG-1 και Hsp70 επάγοντας την αποικοδόμησή τους από το πρωτεάσωμα (Kastle και Grune, 2012). Επιπλέον, έχει προταθεί ότι, σε καταστάσεις στρες η μοριακή συνοδός Hsp70 αλληλεπιδρά με το 19S RP με αποτέλεσμα την αποσυγκρότησή του από το 20S CP προωθώντας έτσι την αποικοδόμηση των οξειδωμένων πρωτεϊνών από το 20S CP (Grune et al., 2011). Μία άλλη μοριακή συνοδός, η Hsp27, φαίνεται επίσης να αλληλεπιδρά με το 19S RP συμμετέχοντας στην πολυουβικιτινίωση των υποστρωμάτων (Parcellier, 2003 και 2006; Lanneau et al., 2010).

Από την άλλη πλευρά, η δυσλειτουργία του πρωτεασώματος αυξάνει το πρωτεοτοξικό στρες, με αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης των μοριακών συνοδών Hsps μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα HSF-1 (Heat Shock Factor -1) (Goldberg, 2003). Σε συνθήκες απουσίας στρες, ο μεταγραφικός παράγοντας HSF-1 παραμένει ανενεργός στο κυτταρόπλασμα, καθώς είναι προσδεμένος στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο p97/CDC48-HDAC6-Hsp90. Παρουσία στρες (π.χ. πρωτεασωμική δυσλειτουργία), η πρωτεΐνη HDAC6 «ανιχνεύει» τη συσσώρευση των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών και προάγει την ενεργοποίηση της αυτοφαγίας, ενώ το σύμπλοκο p97/CDC48-Hsp90-HSF-1 διαχωρίζεται. Έτσι, ο μεταγραφικός παράγοντας HSF-1 μπορεί να επάγει την ενεργοποίηση της έκφρασης των γονιδίων των μοριακών συνοδών (Boyault et al., 2007). Η λειτουργική αλληλεπίδραση του πρωτεασώματος και των μοριακών συνοδών δεν περιορίζεται μόνο στο κυτταρόπλασμα, αλλά λαμβάνει χώρα επίσης και στα μιτοχόνδρια (με τη συμμετοχή της Parkin και της HDAC6), καθώς και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Παρουσία στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο λόγω συσσώρευσης μη σωστά διπλωμένων πρωτεϊνών, ενεργοποιείται το μονοπάτι απόκρισης μη διπλωμένων πρωτεϊνών UPR (unfolded protein response) που μέσω της διαμεσολάβησης μιας σειράς μοριακών συνοδών (BiP-Binding immunoglobulin protein, PDI)• των E3 λιγασών που εντοπίζονται στη μεμβράνη του ER,

καθώς και του συμπλόκου p97/VCP (valosin-containing protein)/Cdc48 που έχει δράση μοριακής συνοδού, το υπόστρωμα προωθείται για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα (Nishikawa et al., 2005; Nanua et al., 2011; Brodsky, 2012) (Εικ. 1.2).

1.3.5.3 Το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και οι κυτταρικές αντιοξειδωτικές αποκρίσεις

Η απόκριση του κυττάρου στο οξειδωτικό στρες παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της πρωτεόστασης. Το κύριο αντιοξειδωτικό σηματοδοτικό μονοπάτι είναι αυτό του Nrf2/Keap1 (Sykiotis και Bohmann, 2010). Η πρωτεΐνη Keap1 έχει δομή πρόσδεσης στην ακτίνη και διαθέτει ένα αμινο-τελικό μοτίβο BTB/POZ και ένα καρβοξυ-τελικό μοτίβο Kelch για την πρόσδεση της E3 λιγάσης cullin 3 (cullin 3-dependent E3 ligase-Cul3) και του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, αντίστοιχα (Furukawa και Xiong, 2005). Απουσία οξειδωτικού στρες, η πρωτεΐνη Keap1 είναι προσδεδεμένη τόσο με τη λιγάση Cul3 όσο και με τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2. Έτσι, η λιγάση Cul3 ουβικιτινώνει τον Nrf2, ο οποίος οδηγείται για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα (Villeneuve et al., 2010). Το σύμπλοκο Keap1/Cul3 εντοπίζεται στο κυτοσόλιο και στον πυρήνα, καθώς η πρωτεΐνη Keap1 διαθέτει σήμα εξόδου από τον πυρήνα (nuclear export signal -NES) (Kaspar et al., 2012). Η πρωτεΐνη Keap1 είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στο οξειδωτικό στρες, καθώς διαθέτει μια σειρά από κατάλοιπα κυστεΐνης που δρουν ως αισθητήρες σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες (Holland και Fishbein, 2010). Έτσι, παρουσία οξειδωτικού στρες, ο Nrf2 ενεργοποιείται και συσσωρεύεται στον πυρήνα, όπου διμερίζεται με την πρωτεΐνη maf. Το διμερές στη συνέχεια προσδένεται σε στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης (Antioxidant Response Elements; AREs) και ενεργοποιεί την έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων, καθώς και των ενζύμων αντιοξειδωτικής απόκρισης της φάσης II (Sykiotis και Bohmann, 2010; Kansanen et al., 2013; Bryan et al., 2013; Numazawa et al., 2004). Ο Nrf2 μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί από φωσφορυλίωση, καθώς έχει δείχθει ότι η κινάση PKR-like endoplasmic reticular (PERK) φωσφορυλιώνει τον Nrf2 παρουσία στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Cullinan et al., 2003), ενώ η κινάση Protein kinase C (PKC) φωσφορυλιώνει τον Nrf2 στη σερίνη 40 προωθώντας έτσι την ενεργοποίησή του (Niture et al., 2009). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, προηγούμενες *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι ο Nrf2 επάγει την ενεργοποίηση της έκφρασης του πρωτεασώματος παρουσία οξειδωτικού στρες και έτσι, θεωρείται υποψήφιος μεταγραφικός παράγοντας ρύθμισης της έκφρασης των πρωτεασωματικών γονιδίων (Kwak et al., 2003; Grimberg et al., 2011).

Παρόλα αυτά, είναι αναγκαία η συστηματική μελέτη της εμπλοκής του μονοπατιού Nrf2/keap1 στη ρύθμιση του πρωτεασώματος σε ένα *in vivo* μοντέλο, προκειμένου να διαλευκανθεί περαιτέρω το θέμα.

1.4 Η ρύθμιση του συστήματος ουβικιτίνης κατά την κυτταρική γήρανση και την *in vivo* γήρανση

Τα επίπεδα έκφρασης της ουβικιτίνης, καθώς και των ενζύμων ουβικιτινίωσης E1, E2 και E3 φαίνεται να παραμένουν σχετικά σταθερά κατά τη γήρανση (Gray et al., 2003), αν και έχει δειχθεί ότι τα επίπεδα της ουβικιτίνης και των τριών ενζύμων ουβικιτινίωσης εμφανίστηκαν μειωμένα στον επιθηλιακό ιστό του φακού από βοοειδή (Jahngen et al., 1990), αλλά και σε περιπτώσεις εμφάνισης καταρράκτη σε ηλικιωμένους ανθρώπους (Hawse et al., 2004; Ruotolo et al., 2003). Στα ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα, η γήρανση έχει συσχετιστεί με τη συσσώρευση μιας μεταλλαγμένης μορφής της ουβικιτίνης (Ubb+1), αλλά και τη συσσώρευση ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών (van Leeuwen et al., 1998; Chondrogianni et al., 2003; Van Tijn et al., 2007). Η μεταλλαγμένη μορφή της ουβικιτίνης, Ubb+1, δημιουργείται από έλλειψη ενός δι-νουκλεοτιδίου στο γονίδιο της ουβικιτίνης που φαίνεται να προκαλεί πρωτεασωματική δυσλειτουργία και απόπτωση (De Vrij et al., 2001; Hope et al., 2003; Tan et al., 2007; Van Tijn et al., 2007). Η Ubb+1 έχει εμπλακεί επίσης σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες (van Leeuwen et al., 1998; Irmeler et al., 2012) ενώ η υπερέκφραση μεταλλαγμένης ουβικιτίνης (διαφορετική μετάλλαξη από αυτή που φέρει η Ubb+1) οδήγησε σε αύξηση του οξειδωτικού στρες και εμφάνιση ασθενειών που σχετίζονται με το γήρας (Hyun, 2010).

Τα περισσότερα από τα ένζυμα του συστήματος ουβικιτίνης έχουν συνδεθεί με την κυτταρική και την *in vivo* γήρανση. Συγκεκριμένα, μεταλλάξεις στο γονίδιο του ενζύμου ενεργοποίησης της ουβικιτίνης E1 στη *Drosophila* που οδήγησε στην έκφραση μη λειτουργικού ενζύμου E1 είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του προσδόκιμου ζωής (Liu και Pfleger, 2013). Επιπλέον, μείωση της έκφρασης ή εξάλειψη της έκφρασης δύο πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη δημιουργία συμπλόκων με λειτουργία E3 λιγασών σε κύτταρα θηλαστικών• των ROC1 (συμμετέχει στη δημιουργία του συμπλόκου SCF) και Cdh1 (συμμετέχει στη δημιουργία του συμπλόκου APC) οδήγησε σε κυτταρική γήρανση (Jia et al., 2009; Li et al., 2008). Επίσης, μια μεταλλαγμένη μορφή της E3 λιγασής Parkin συσχετίστηκε με κυτταρικές αποκρίσεις σε βλάβη του DNA και συνέβαλε στην εμφάνιση της γήρανσης, καθώς και σε ασθένειες που σχετίζονται με το γήρας (Shimura et al., 2000; Schulz, 2008; Kao, 2009). Επίσης, η υπερέκφραση της E3 λιγασής Senescence Evasion Factor^{Prp19/Pso4} (SNEV^{Prp19/Pso4}), σε ανθρώπινα κύτταρα καθυστέρησε την ΑΚΓ και αύξησε την ανθεκτικότητα στο στρες (Voglauer et al., 2006)• αντίθετα η έλλειψή της οδήγησε σε θνησιμότητα σε πρώιμο στάδιο της ανάπτυξης σε ποντίκια και σε πρόωμη γήρανση σε εβρουϊκούς ινοβλάστες από ποντίκια (Fortschegger et al., 2007).

1.5 Μεταβολές του πρωτεασώματος κατά την κυτταρική και την *in vivo* γήρανση

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το πρωτεάσωμα είναι το κύριο πρωτεολυτικό μονοπάτι αποικοδόμησης πρωτεϊνών με μικρό χρόνο ζωής που έχουν σημαθεί με ουβικιτίνη καθώς και οξειδωμένων ή μη λειτουργικών πρωτεϊνών (Mecocci et al., 1999; Zainal et al., 2000; Kanski et al., 2003; Kastle και Grune, 2011). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η ενεργότητα του πρωτεασώματος μειώνεται κατά την κυτταρική και την *in vivo* γήρανση (Merker et al., 2000; Sitte et al., 2000a, b; Carrard et al., 2002; Chondrogianni et al., 2003; Grune et al., 2005; Vernace et al., 2007; Breusing et al., 2009; Fredriksson et al., 2012). Οι παραπάνω μελέτες αναφέρονται κυρίως στο κυτταροπλασματικό πρωτεάσωμα, καθώς μελέτες σε ανθρώπινα κύτταρα έδειξαν ότι η ενεργότητα του πυρηνικού πρωτεασώματος παραμένει σχετικά σταθερή κατά τη γήρανση (Merker et al., 2003). Πιο συγκεκριμένα, η ενεργότητα του πρωτεασώματος βρέθηκε να μειώνεται σε κύτταρα θηλαστικών κατά την κυτταρική γήρανση (Chondrogianni et al., 2003) και σε κύτταρα που λήφθηκαν από ηλικιωμένους δότες (Carrard et al., 2002), καθώς και κατά την *in vivo* γήρανση στη *Drosophila* (Vernace et al., 2007; Fredriksson et al., 2012). Η μείωση της πρωτεασωματικής ενεργότητας φαίνεται πως συνδυάζεται με μείωση της έκφρασης του πρωτεασώματος κατά τη γήρανση (Fredriksson et al., 2012; Vernace et al., 2007) χωρίς να είναι γνωστός ο μηχανισμός αυτής της μειορρύθμισης της έκφρασης του πρωτεασώματος. Η μείωση της λειτουργικότητας του πρωτεασώματος έχει συσχετιστεί επίσης με ασθένειες του γήρατος, όπως η νόσος Αλτσχάιμερ (Alzheimer's disease) και Πάρκινσον (Parkinson's disease), στις οποίες η ενεργότητα του πρωτεασώματος εμφανίστηκε μειωμένη (Ciechanover και Brundin, 2003; Takalo et al., 2013). Επίσης, η βλάβη του πρωτεασώματος σε πρώιμα στάδια ανάπτυξης του ποντικού συσχετίστηκε με την εμφάνιση νευροεκφυλισμού (Romero-Granados et al., 2011). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ενεργότητα και η έκφραση του πρωτεασώματος φαίνεται να αυξάνονται κατά την καρκινογένεση. Σε αρκετούς τύπους καρκίνου, η αύξηση της ενεργότητας του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος, κατά την καρκινογένεση, ενδεχομένως συνδέεται με την προσπάθεια προσαρμογής των καρκινικών κυττάρων σε καταστάσεις υψηλού πρωτεοτοξικού στρες (Trogakos et al., 2013). Επομένως, το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος θεωρείται τα τελευταία χρόνια στόχος για την ανάπτυξη αντι-καρκινικών θεραπειών. Ως εκ τούτου, αρκετοί αναστολείς του πρωτεασώματος βρίσκονται στη φάση των κλινικών δοκιμών, ενώ η αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα του πρωτεασωματικού αναστολέα Bortezomib (PS-341 ή Velcade) ενάντια στο πολλαπλό μυέλωμα, αλλά και σε άλλες αιματολογικές κακοήθειες (Kane et al., 2007; Dimopoulos et al., 2011), παρέχει πλέον την απόδειξη ότι η στόχευση του πρωτεασώματος είναι μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική για τη θεραπεία του καρκίνου.

Η γήρανση φαίνεται να επηρεάζει κυρίως τη λειτουργικότητα του 26S πρωτεασώματος (Ferrington et al., 2005; Vernace et al., 2007; Tonoki et al., 2009; Fredriksson et al., 2012), πολύ πιθανόν εξαιτίας της εμπλοκής του 20S CP στην απομάκρυνση των οξειδωμένων πρωτεϊνών που τείνουν να συσσωρεύονται κατά τη γήρανση (Reinheckel et al., 1998; Kastle και Grune, 2011). Από την άλλη πλευρά, το πρωτεάσωμα υφίσταται τροποποιήσεις λόγω οξείδωσης, όπως καρβονυλίωση ή γλυκο-οξείδωση, ενώ επίσης, φαίνεται να τροποποιείται και από τα προϊόντα της οξείδωσης των λιπιδίων (Höhn και Grune, 2014). Αυτές οι τροποποιήσεις πιθανώς ρυθμίζουν τη λειτουργία του πρωτεασώματος, ωστόσο, ο μηχανισμός παραμένει άγνωστος.

Η ομαλή λειτουργία του πρωτεασώματος φαίνεται πως είναι καθοριστικός παράγοντας για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιοστασίας, καθώς η μερική αναστολή του πρωτεασώματος σε νεαρούς ανθρώπινους ινοβλάστες (Torres et al., 2006, Chondrogianni et al., 2008), όπως και η μείωση της ενεργότητας χυμοθρυψίνης του πρωτεασώματος σε ποντίκια (Tomaru et al., 2012) οδήγησε σε πρόωμη γήρανση. Επιπλέον, η δυσλειτουργία του πρωτεασώματος φαίνεται να προωθεί τη γενωμική αστάθεια (Catalgol et al., 2010). Η σημαντική εμπλοκή του πρωτεασώματος στην ομοιοστασία του οργανισμού αποδεικνύεται από το γεγονός ότι η βλάβη του πρωτεασώματος έχει σοβαρή επίπτωση στην εμβρυογένεση. Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση των μη λειτουργικών υπομονάδων β2 και β6 του πρωτεασώματος στη *Drosophila* προκάλεσε θνησιμότητα στο στάδιο της νύμφης του εντόμου (Covi et al., 1999). Παρόμοιος φαινότυπος εμφανίστηκε και μετά από μείωση της έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων Rpn11 και Rpn10 (Szlanka et al., 2003; Tonoki et al., 2009) χωρίς όμως να αναλυθούν οι μοριακές επιπτώσεις της βλάβης του πρωτεασώματος στον οργανισμό. Ακόμη, η απορρύθμιση της λειτουργίας του πρωτεασώματος στους δίσκους ενήλικου του ματιού και του φτερού της *Drosophila* οδήγησε σε σοβαρή διαταραχή της ανάπτυξης αυτών των ιστών (Velentzas et al., 2013).

Από την άλλη πλευρά, η υπερέκφραση της καταλυτικής υπομονάδας β5 σε ανθρώπινα κύτταρα αύξησε τα επίπεδα του πρωτεασώματος, την ανθεκτικότητα στο οξειδωτικό στρες, ενώ επίσης καθυστέρησε την εμφάνιση κυτταρικής γήρανσης (Chondrogianni et al., 2005). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν επίσης ότι η υπερέκφραση της ρυθμιστικής υπομονάδας Rpn11 (Tonoki et al., 2009), καθώς και της Rpn6 (Vilchez et al., 2012a) στη *Drosophila*, αυξάνει τον χρόνο ζωής του εντόμου, ενώ η αύξηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας στο ζυμομύκητα προκάλεσε αύξηση της ανθεκτικότητας των κυττάρων στο πρωτεοτοξικό στρες (Kruegel et al., 2011). Επιπλέον, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Ump1 στους ανθρώπινους ινοβλάστες αύξησε τα επίπεδα των λειτουργικών πρωτεασωμάτων (Chondrogianni et al., 2007), ενώ τέλος, η επέκταση του χρόνου ζωής στο *C. elegans* μετά από εξάλειψη της γαμετικής σειράς συσχετίστηκε με την αυξημένη έκφραση της πρωτεασωμικής υπομονάδας

Rpn-6, καθώς και της πρωτεασωματικής ενζυμικής ενεργότητας στους σωματικούς ιστούς (Vilchez et al., 2012a).

1.6 Μη ενζυματικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις κατά τη γήρανση: Λιποφουσκίνη-Τελικά Προϊόντα Πρωτεϊνικής Γλυκοζυλίωσης (AGEs)

Μεταξύ των πρωτεϊνικών τροποποιήσεων που σχετίζονται με τη γήρανση περιλαμβάνονται οι τροποποιήσεις που δημιουργούνται από οξειδωμένους και γλυκοζυλιωμένους παράγοντες, με αποτέλεσμα τη δημιουργία έντονα οξειδωμένων και/ή αδιάλυτων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων (γνωστών ως λιποφουσκίνη), καθώς και την τροποποίηση των πρωτεϊνών από τα ώριμα τελικά προϊόντα γλυκοζυλίωσης (AGEs). Οι τροποποιήσεις αυτές συσσωρεύονται κατά τη γήρανση και συμβάλλουν στη δυσλειτουργία των μηχανισμών διατήρησης της πρωτεόστασης, προκαλώντας πρωτεωμική αστάθεια.

Πιο συγκεκριμένα, η λιποφουσκίνη αποτελεί συσσωματώματα ομοιοπολικά συνδεδεμένων οξειδωμένων πρωτεϊνών, λιπιδίων και σακχάρων (Jung et al., 2007). Η λιποφουσκίνη συσσωρεύεται στα λυσοσώματα κατά τη γήρανση χωρίς να είναι δυνατόν να αποικοδομηθεί από τα πρωτεολυτικά συστήματα του κυττάρου (Marzabadi et al., 1991; Yin, 1996; Jung et al., 2007). Η δημιουργία της λιποφουσκίνης αυξάνεται με την ηλικία και εξαρτάται από το ρυθμό της οξειδωτικής βλάβης των πρωτεϊνών, καθώς και από τη λειτουργία των μιτοχονδρίων και των πρωτεολυτικών συστημάτων (Sitte et al., 2000; Terman et al., 2006; Jung et al., 2007). Επιπρόσθετα, έχειδειχθεί ότι μπορεί να συσσωρεύεται και στο κυτοσόλιο, όταν υπάρχει δυσλειτουργία της αυτοφαγίας και του λυσοσώματος (Hohn et al., 2012). *In vitro* μελέτες έδειξαν ότι η λιποφουσκίνη μπορεί να αναστείλει την ενεργότητα του πρωτεασώματος (Höhn et al., 2011), καθώς και ότι η κυτταροτοξικότητά της εξαρτάται από την τάση να ενσωματώνει μέταλλα μετάπτωσης, τα οποία συμμετέχουν σε αντιδράσεις που δημιουργούν ROS με αποτέλεσμα την περαιτέρω βλάβη του κυτάρου (Höhn et al., 2010).

Τα AGEs δημιουργούνται μέσω μη ενζυμικής αντίδρασης αναγωγικών σακχάρων με πρωτεϊνικές αμινο-ομάδες, μια διαδικασία που εξελίσσεται σχετικά αργά στα βιολογικά συστήματα και φαίνεται να σχετίζεται με τη γήρανση, αλλά και με παθολογικές καταστάσεις, όπως ο διαβήτης, τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα και ο καρκίνος (Ulrich και Cerami, 2001; Takeuchi και Yamagishi, 2009; Nedić et al., 2013). Ενδιαφέρον εμφανίζει το γεγονός ότι τα AGEs αποτελούν παραπροϊόντα κατά την παρασκευή διαφόρων τροφίμων (Uribarri et al., 2005). Συγκεκριμένα, AGEs υπάρχουν σε τροφές πλούσιες σε λιπαρά, καθώς και σε αυτές που παρασκευάζονται σε υψηλή θερμοκρασία (Assar et al., 2009). Πρόσφατα, τα AGEs προτάθηκαν ως βιοδείκτης *in vivo* γήρανσης στη *Drosophila* (Jacobson et al., 2010). Επίσης, η χρόνια λήψη AGEs έχει συνδεθεί με την εμφάνιση διαβήτη (Cai et al., 2012), ενώ δίαιτα με

χαμηλό περιεχόμενο γλυκοτοξινών οδήγησε σε μείωση του οξειδωτικού στρες και αύξηση του προσδόκιμου ζωής στον ποντικό (Cai et al., 2007). Έχει προταθεί ότι η κυτταροτοξικότητα των AGEs οφείλεται κυρίως στη σύνδεσή τους με τον υποδοχέα των AGEs, που ονομάζεται RAGE (Receptor of AGEs). Συγκεκριμένα η έντονη ενεργοποίηση του RAGE προκαλεί αύξηση των ROS και αύξηση της φλεγμονής μέσω μιας σειράς σηματοδοτικών μονοπατιών (Yamagishi et al., 2002; Bansal et al., 2012). Όπως η λιποφουσκίνη, έτσι και τα AGEs, φαίνεται ότι δεν μπορούν να αποικοδομηθούν από τα πρωτεολυτικά συστήματα του κυττάρου, αν και πρόσφατα δείχτηκε σε ανθρώπινα κύτταρα ότι η καθεψίνη D εμπλέκεται στην ενδοκυτταρική αποικοδόμηση των πρωτεϊνών που έχουν τροποποιηθεί με AGEs (Grimm et al., 2010). Επιπλέον, τόσο η καθεψίνη D όσο και η καθεψίνη L φαίνεται να εμπλέκονται στη μείωση της κυτταροτοξικότητας που προκαλούν τα AGEs (Grimm et al., 2012).

Παρόλα αυτά, θα πρέπει να σημειωθεί ότι τόσο οι *in vivo* επιδράσεις όσο και οι μοριακές επιπτώσεις των μη ενζυματικά τροποποιημένων πρωτεϊνών AGEs ή της λιποφουσκίνης στη φυσιολογία του οργανισμού παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστες. Δεδομένου ότι οι τροφές που καταναλώνουμε καθημερινά είναι αρκετά περιεκτικές σε AGEs είναι σημαντική η ύπαρξη νέων μελετών πάνω σε αυτό το πεδίο.

2. ΣΚΟΠΟΣ – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ

2. ΣΚΟΠΟΣ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ

2.1. Σκοπός

Δεδομένου, 1) ότι η ρύθμιση του πρωτεασώματος κατά την *in vivo* γήρανση στα ανώτερα μετάζωα δεν έχει μελετηθεί συστηματικά (κυρίως διότι τα περισσότερα γενετικά μοντέλα εμφάνισαν θνησιμότητα στα στάδια της ανάπτυξης), 2) του μεγάλου βιοϊατρικού ενδιαφέροντος για το σύστημα UPS ως θεραπευτικού στόχου για την αντιμετώπιση διάφορων ασθενειών (όπως ο καρκίνος), καθώς και ότι, 3) τα τρόφιμα που καταναλώνουμε καθημερινά (ειδικότερα στο δυτικό κόσμο) είναι πλούσια σε AGEs και/ ή λιποφουσκίνη• των οποίων η επίπτωσή τους στη φυσιολογία του οργανισμού δεν είναι ξεκάθαρη, οι **στόχοι της συγκεκριμένης Διατριβής** [η οποία αποτελεί συνέχεια της μεταπτυχιακής μου εργασίας (2010)] αφορούσαν:

- Στην μελέτη των μεταβολών του πρωτεώματος κατά την *in vivo* γήρανση.
- Στην συστηματική μελέτη της φυλο-, ιστο-, ηλικιο- και στρεσο-εξαρτώμενης ρύθμισης και λειτουργίας του πρωτεασώματος κατά την *in vivo* γήρανση.
- Στη λεπτομερή χαρτογράφηση της επίδρασης της ειδικής καταστολής (μέσω RNAi) έκφρασης υπομονάδων του 20S και 19S πρωτεασώματος στη φυσιολογία του οργανισμού και την κυτταρική ομοιοστασία.
- Στην *in vivo* μελέτη της επίδρασης διατροφικών AGEs και/ή της λιποφουσκίνης στη φυσιολογία του οργανισμού και στο προσδόκιμο μακροβιότητας.

2.2. Το έντομο *Drosophila melanogaster*

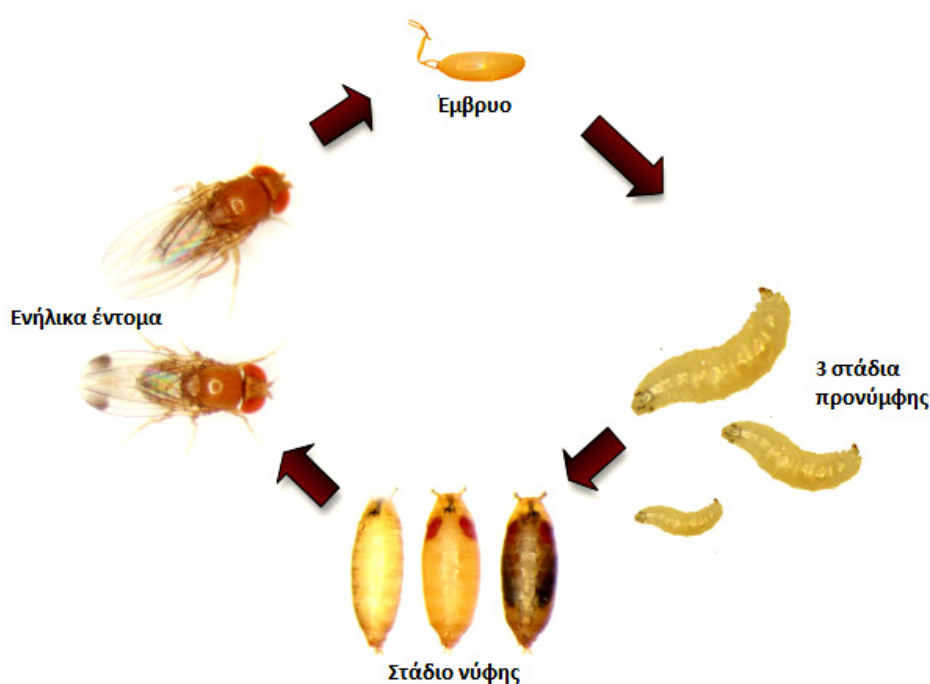
Το κύριο πειραματικό μοντέλο της παρούσας Διατριβής ήταν το δίπτερο έντομο *Drosophila melanogaster*. Η *Drosophila* αποτελεί ένα από τα πιο χρήσιμα πειραματικά μοντέλα μελέτης της *in vivo* γήρανσης (Helf και Rogina, 2003; Shaw et al., 2008) λόγω του μικρού χρόνου ζωής, του μικρού της μεγέθους, του σύντομου βιολογικού κύκλου της (που διαρκεί περίπου 10 ημέρες σε θερμοκρασία 25°C), καθώς και του μεγάλου εύρους των γενετικών χειρισμών που είναι διαθέσιμες.

Συγκεκριμένα, είναι δυνατή η υπερέκφραση ή η καταστολή έκφρασης μιας πρωτεΐνης με τη χρήση (μεταξύ των άλλων) του συστήματος GAL4/UAS, καθώς και με τη χρήση της τεχνικής της παρεμβολής του RNA (RNAi), αντίστοιχα, τα οποία θα αναφερθούν πιο εκτενώς στο κεφάλαιο *Υλικά και Μέθοδοι*. Επίσης, το πειραματικό μοντέλο *D. melanogaster* είναι ιδανικό για τέτοιου είδους μελέτες, καθώς το πρωτεάσωμά του είναι όμοιο με αυτό των θηλαστικών, στο έντομο υπάρχουν τόσο μεταμιτωτικά όσο και μιτωτικά κύτταρα, ενώ ακόμα,

πολλά μεταβολικά μονοπάτια, καθώς και το μονοπάτι Nrf2/Keap1 είναι όμοια με αυτά των θηλαστικών (Kim, 2007).

2.2.1. Φυσιολογική ανάπτυξη της *Drosophila*

Η *Drosophila* ανήκει σε μία από τις οικογένειες εντόμων (Δίπτερα) που υφίσταται πλήρη μεταμόρφωση. Έτσι, μετά την εκκόλαψη του εμβρύου προκύπτει μια προνύμφη (larva), η οποία διαφέρει δομικά από το ενήλικο άτομο. Η προνύμφη αναπτύσσεται και υφίσταται δύο εκδύσεις πριν φτάσει σε ένα στάδιο ηρεμίας, το οποίο ονομάζεται νύμφη (pupa). Στο στάδιο αυτό, το σώμα αναπλάθεται, για να σχηματιστεί το ενήλικο άτομο που κυρίως σχηματίζεται από τους δίσκους ενηλίκου και τους κοιλιακούς ιστοβλάστες (Εικ. 2.1).



Εικόνα 2.1 Φυσιολογική ανάπτυξη της *Drosophila melanogaster*. Μετά την εκκόλαψη του ωοθυλακίου, η προνύμφη περνά από τρία στάδια, μεταξύ των οποίων μεσολαβούν τρεις εκδύσεις. Κατά την περίοδο αυτή τρέφεται αδιάκοπα και αυξάνει σημαντικά σε μέγεθος, χωρίς όμως να αλλάζει ιδιαίτερα η μορφολογία της. Η προνύμφη του τρίτου σταδίου μεταπίπτει σε νύμφη• μια διαδικασία κατά την οποία το μεγαλύτερο τμήμα του σώματος της προνύμφης αφομοιώνεται και αντικαθίσταται από τις δομές του ενήλικου ατόμου που αναπτύσσονται από τους δίσκους ενηλίκου.

(πηγή: <http://www.mountvernon.wsu.edu/entomology/pests/swd.html>).

2.2.1.1. Ωογένεση

Κατά την αρχή της ωογένεσης, το γαμετικό κύτταρο διαιρείται τέσσερις φορές με αποτέλεσμα το σχηματισμό 16 κυττάρων, από τα οποία το ένα εξελίσσεται σε ωοκύτταρο και τα υπόλοιπα 15 σε τροφοκύτταρα. Ολόκληρο το σύμπλεγμα ωοκυττάρου-τροφοκυττάρων (γαμετικής προέλευσης) περιβάλλεται από τα θυλακοκύτταρα των ωοθυλακίων (σωματικής

προέλευσης) σχηματίζοντας μια δομή που καλείται ωοθυλάκιο (Trougakos και Margaritis, 2002). Τα θυλακοκύτταρα προέρχονται από τις γονάδες και κατά συνέπεια από τη σωματική και όχι από τη γαμετική σειρά (Slack, 2006).

2.2.1.2. Εμβρυογένεση

Κατά τη γονιμοποίηση το σπερματοζώαριο εισέρχεται από το εμπρόσθιο άκρο και ειδικότερα από μία οπή του κελύφους του ωοθυλακίου που ονομάζεται μικροπύλη. Η αρχική περίοδος αποτελείται από γρήγορες πυρηνικές διαιρέσεις και ονομάζεται αυλάκωση. Κατά το πρώιμο αυτό στάδιο, ολόκληρο το έμβρυο συγκροτεί ένα συγκύτιο, στο οποίο όλοι οι πυρήνες μοιράζονται το κοινό κυτταρόπλασμα. Στη συνέχεια, ακολουθεί ο σχηματισμός των πολικών κυττάρων, από τα οποία προκύπτουν τα γαμετικά κύτταρα, έπεται το συγκυτιακό βλαστώδερμα, το οποίο μετά το διαχωρισμό των πυρήνων θα δώσει το κυτταρικό βλαστώδερμα. Ακολούθως, ξεκινά η γαστριδίωση που οδηγεί στο σχηματισμό των τριών βλαστικών στιβάδων, από τις οποίες θα προκύψουν τα όργανα του εντόμου (Slack, 2006).

2.2.1.3. Στάδια της προνύμφης

Η προνύμφη της *Drosophila* δεν έχει πόδια, το κεφάλι της είναι αναδιπλωμένο στο εσωτερικό και φέρει τρία θωρακικά και οκτώ ορατά κοιλιακά μεταμερή. Στην κοιλιακή πλευρά της προνύμφης, σε καθένα από τα θωρακικά και κοιλιακά μεταμερή υπάρχουν ζώνες οδοντιδίων των οποίων το σχήμα και το μέγεθος είναι διαφορετικό για θωρακικά και κοιλιακά μεταμερή. Το οπίσθιο άκρο της προνύμφης δεν παρουσιάζει μεταμερισμό και ονομάζεται τέλσο, ενώ η δομή της κεφαλής είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη, καθώς παρουσιάζει ένα κεράτινο κεφαλοφαρυγγικό σκελετό που εκκρίνεται από την πεπτική οδό (Slack, 2006).

2.2.1.4. Το ενήλικο άτομο

Τα αγρίου τύπου έντομα (wild type) έχουν κόκκινα μάτια και παρουσιάζουν φυλετικές διαφορές. Τα θηλυκά άτομα είναι περίπου 2,5 χιλιοστά μακρύτερα από τα αρσενικά άτομα και μπορούν να γεννήσουν έως και 800 αυγά. Τα αρσενικά εμφανίζουν σκούρο χρώμα στο άκρο της κοιλιάς τους και διαθέτουν ένα ζευγάρι «γάντζων» (sex combs) στο μπροστινό ζεύγος ποδιών, το οποίο είναι απαραίτητο για την σεξουαλική επαφή.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

3.1.1 Χημικά αντιδραστήρια

Χημικά αντιδραστήρια	Εταιρεία	Αριθμός καταλόγου
0.5 % Trypsin-EDTA (10X)	Gibco life technologies	15400-054
2-μερκαπτοαιθανόλη	Merck	15433
5-KAI-6-CHLOROMETHYL-2 (DCF-DA)	Invitrogen	C6827
Amplex Red H ₂ O ₂ assay kit	Invitrogen	A22188
APS	Research Organics	9530A
Αγαρόζη (low melting)	Scharlau	AG00300100
Biorad protein assay	Biorad	500-0006
Boc-Leu-Arg-Arg-AMC	Enzo life sciences	BML-BW8515-0005
BSA	Sigma	A9418
Βρωμοφαινόλη μπλε	Sigma	B-6896
CaCl ₂	Sigma	429759
ClCH ₂ COONa	Fluka	24610
Coomassie brilliant blue R-250	Fluka	27816
Cytochrome c from bovine heart	Sigma	C3131
Developer D-19	Kodak	146 4593
DMSO	Sigma	270431
DTT	Sigma	248531
Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM)	Gibco life technologies	41966-029
ECL (Enhanced ChemiLuminescence)	Santa Cruz Biotechnology	Sc-2048
EDTA	Research organics	9572E
EGTA	Sigma	03777
Epoximycin	Alexis Biochemicals	ALX-350-254
EtBr	Sigma	E1510
EtOH	Merck	1.00983.2511
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco life technologies	10270-106
Fixer Fix-100	Agfa	G382B
Go-Taq Green Master mix	Promega	M7112
Hepes	Sigma	H-0891
KCl	Sigma	P-9333
KCN	Sigma	11812
L-Glutamine 200 mM (10X)	Gibco life technologies	25030-024
L-υδροχλωρική κυστεΐνη	Sigma	C-1276
Maxima® SYBR Green/ROX Qpcr Master Mix,	Thermo Scientific	K0222
MG-132	Enzo life sciences	260-092-M005
MgCl ₂	Scharlau	MA00360
Mifepristone(RU486)	Sigma	M8046
Μεθανόλη	Merck	1.06009.2511
NaCl	Merck	1.06405.1000
NaHCO ₃	Fluka	24610-250G
Nonidet P-40	Sigma	74385
Paraquat	Sigma	36541
PBS (Phosphate buffered saline)	Sigma	P4417

Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20)	Sigma	P-1379
PS-341	Millennium Pharmaceuticals	-
RNAzol	Molecular Research Center, Inc	RN190-100
SDS	Serva	20765
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC	Enzo life sciences	BML-P802-0005
Sulforhodamine B sodium salt (Acid Red)	Sigma	230162
t-BHP	Sigma	B2633
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Merck	1107320100
Tiron	Sigma	D7389
Tris	Research Organics	9680T
Triton X-100	BDH	30632
Trypsin from bovine pancreas	Sigma	T1426
Z-Leu-Leu-Glu-AMC	Enzo life sciences	BML-ZW9345-0005
Z-Phe-Arg-AMC	Enzo life sciences	ALX-260-131-M005
Άγαρ	Fluka	05040
Ακρυλαμίδη	Research Organics	9502A
Γλυκερόλη	Sds	6023516
Γλυκίνη	Serva	23390
Διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου	Sigma	31642
Ηλεκτρικό οξύ	Sigma	239682
Ινδοφαινόλη	Sigma	I5763
Κιτ ανίχνευσης οξειδωμένων πρωτεϊνών (OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit)	Chemicon	S7150
Κιτ σύνθεσης cDNA (iScript cDNA synthesis Kit)	Biorad	170-8890
Κοκτέιλ από αναστολείς πρωτεασών	Sigma	P8340
Μάρτυρας πρωτεΐνης (έτοιμος για χρήση)	Fermentas	SM0671
Μάρτυρας πρωτεΐνης (έτοιμος για χρήση)	Fermentas	SM1841
Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	Santa Cruz Biotechnology	Sc-3724
Οξικό οξύ (CH ₃ COOH)	Merck	K39105963
Προπιονικό οξύ	Merck	8.00605.1000
Ροτενόνη	Sigma	R8875
Σουκρόζη	Sigma	S0389
Υδροχλωρικό οξύ (HCl) 37%	Merck	K37471017
Φιλμ αυτοραδιογραφίας	Santa Cruz Biotechnology	Sc-201697
φορμαλδεϋδη 16%	Polysciences	18814-20
Φωσφορικό κάλιο τριβασικών	Sigma	P5629
Χαρτιά Whatman	Sigma Aldrich	Z241768
Χλωροφθόρμιο	Sigma	32211

3.1.2 Αντισώματα

Αντισώματα	Εταιρεία	Αριθμός καταλόγου
Πρωτογενή αντισώματα ειδικά για τη <i>Drosophila melanogaster</i>		
26S proteasome α subunit	Santa Cruz	Sc-65755
26S proteasome $\beta 5$ subunit	Ευγενική προσφορά της Dr.Maria Figueiredo-Pereira	
26S proteasome p42A	Santa Cruz	Sc-65750
20S proteasome $\beta 5$ (C-19)	Santa Cruz	Sc-55009
anti-Ubiquitin	Santa Cruz	Sc-8017
anti-AGEs	TransGenic Inc	KAL-KH001
anti-actin	Santa Cruz	Sc-1616
anti-GAPDH	Santa Cruz	Sc-25768
Δευτερογενή αντισώματα		
Anti-Mo-IgG/HRP	Santa Cruz	Sc-2005
Anti-Go-IgG/HRP	Santa Cruz	Sc-2020
Anti-Rb-IgG/HRP	Santa Cruz	Sc-2004

3.1.3 PCR εκκινητές (PCR primers)

Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην πραγματικού χρόνου Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Real-Time PCR)	
Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία
<i>cncC-F</i>	CACTACCCGGGAGTATTCCAAA
<i>cncC-R</i>	TAAGCTTCGCCCAGATTGTG
<i>Keap1-F</i>	GCGCTCGTCAGCCCATT
<i>Keap1-R</i>	GGATGCGCATAATTCCTCTTCTT
<i>atg6-F</i>	GTTCTGCTGCCCTACAAGA
<i>atg6-R</i>	TCCACTGCTCCTCCGAGTTA
<i>prosalpha4-F</i>	GGCAAGCCACTGAAAATGCT
<i>prosalpha4-R</i>	AAGCGATTCAATGCAACGGC
<i>prosalpha7-F</i>	ACCGACGAATTGGTGGAGAG
<i>prosalpha7-R</i>	ACCCATTTCGAAGCGGAAGT
<i>prosbeta1-F</i>	GCGACGCATCTTCTACAACAC
<i>prosbeta1-R</i>	CGAGGAAATGAAGCTGGGAGT
<i>prosbeta5 -F</i>	GCCATCTACCATGCCACCTT
<i>prosbeta5-R</i>	TTACCCAGCCGTCCTCCTTA
<i>Rpn11-F</i>	ACAACAAGTCACTGGAGGACG
<i>Rpn11-R</i>	TGCTTGCCACGTTCTTGAT
<i>Rp49-F</i>	AGCACTTCATCCGCCACC
<i>Rp49-R</i>	ATCTCGCCGCAGTAAACG

Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη συμβατική Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR)	
Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία
<i>CathD-F</i>	CTCCCATCATCGGTGGTCAG
<i>CathD-R</i>	CGTTGCCCATGTCAAACCTCG
<i>Rpn6-F</i>	TCTACTGTCCGCCAAAGGTG

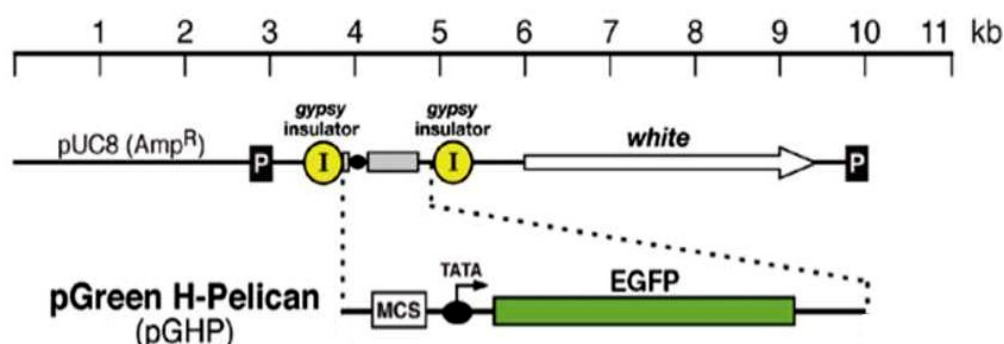
<i>Rpn6-R</i>	TTCCACTGACGAGCTGGTTG
<i>GstD1-F</i>	TGATCAATCAGCGCCTGTACT
<i>GstD1-R</i>	GCAATGTCGGCTACGGTAAG
<i>Rpn11-F</i>	ACTTAAAGACTATGGTGTCCA
<i>Rpn11-R</i>	TGGATCGTCTGCTACGTCTT
<i>A7-F</i>	TTTTCGCCTGATGGCCGCGT
<i>A7-R</i>	ACCGGTTACCCTGCCCACCAA
<i>B1-F</i>	CGAGTCCTGCACCATCGGCG
<i>B1-R</i>	TGCCAATGCGCACCAACACCA
<i>B2-F</i>	AGCCACCGACCACCACCAAGA
<i>B2-R</i>	CCACAACGCGCACCTCACGA
<i>B5-F</i>	TGGCTGCTCCGCCATTTCGAG
<i>B5-R</i>	CCGGCCAGCATCATGCCCAT
<i>ATG6-F</i>	TGTCCTTCGCCTGTCAGCGC
<i>ATG6-R</i>	CGTCCTCAGCGATGCGCAGT
<i>ATG8-F</i>	ACGCCTTCGAGAAGCGTCGC
<i>ATG8-R</i>	CCAAATCACCGATGCGCGCC
<i>CNCC-F</i>	TGGAATTGGGCACCCATGGCG
<i>CNCC-R</i>	ATCATTGAGGGCGGCGGTGC
<i>KEAP1-F</i>	TCCGCCGGCATGGAGTACCA
<i>KEAP1-R</i>	CGCTCCACTGCGACCCGTTT
<i>Rp49-F</i>	AGCACTTCATCCGCCACC
<i>Rp49-R</i>	ATCTCGCCGCAGTAAACG

Οι εκκινητές PCR σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

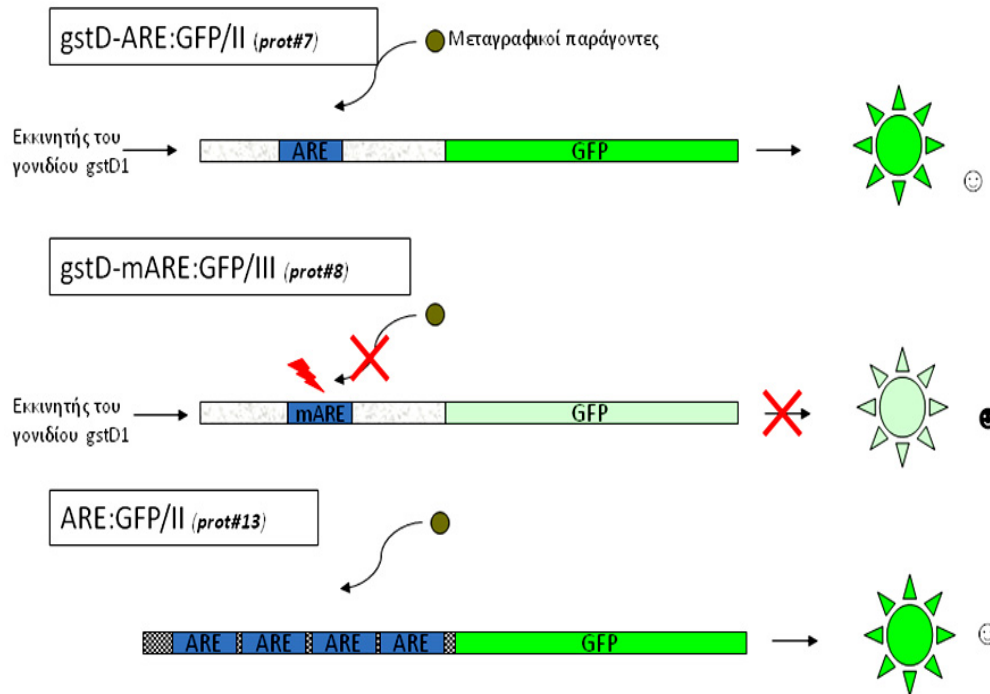
3.1.4 Διαγονιδιακά στελέχη *Drosophila melanogaster*

Τα έντομα *Drosophila melanogaster* που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- φυσιολογικού τύπου Oregon R
- Τα διαγονιδιακά έντομα *gstD*-ARE:GFP/II, *gstD*-Mare:GFP/III και ARE:GFP/II, (προσφορά των Sykietis και Bohmann, University of Rochester, NY), τα οποία «κατασκευάστηκαν» σε έντομα με γενετικό υπόβαθρο w^{1118} με φαινότυπο λευκό χρώμα ματιών. Πιο συγκεκριμένα, με τη μέθοδο Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης [Polymerase Chain Reaction (PCR)] ενισχύθηκε το γενωμικό τμήμα 2708 bp, το οποίο βρίσκεται μεταξύ των γονιδίων *gstD1* και *gstD2* (γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης). Το τμήμα αυτό αποτελεί τον υποκινητή (promoter) των γονιδίων και περιέχει ένα στοιχείο αντιοξειδωτικής απόκρισης (ARE) στο οποίο προσδένονται μεταγραφικοί παράγοντες για να ενεργοποιήσουν την έκφραση των αντιοξειδωτικών γονιδίων *gstD*. Το γενωμικό τμήμα 2708 bp κλωνοποιείται στον φορέα pGreen-Hpelican (Εικ. 3.1). Το στέλεχος *gstD*-Mare:GFP/III δημιουργείται μεταλλάσσοντας την περιοριστική θέση του ενζύμου *XhoI*(TGACCG>CTCGAG) που υπάρχει στο στοιχείο αντιοξειδωτικής απόκρισης, ενώ το διαγονιδιακό στέλεχος ARE:GFP/II περιέχει τέσσερα συνθετικά στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης. Τα παραπάνω διαγονιδιακά έντομα χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της ενεργοποίησης της αντιοξειδωτικής κυτταρικής απόκρισης *in vivo*. Ειδικότερα, τα στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης ενεργοποιούνται από μεταγραφικούς παράγοντες παρουσία οξειδωτικού στρες και επάγουν την ενεργοποίηση της έκφρασης των αντιοξειδωτικών ενζύμων• στη συγκεκριμένη περίπτωση της πρωτεΐνης GFP (Εικ. 3.2).



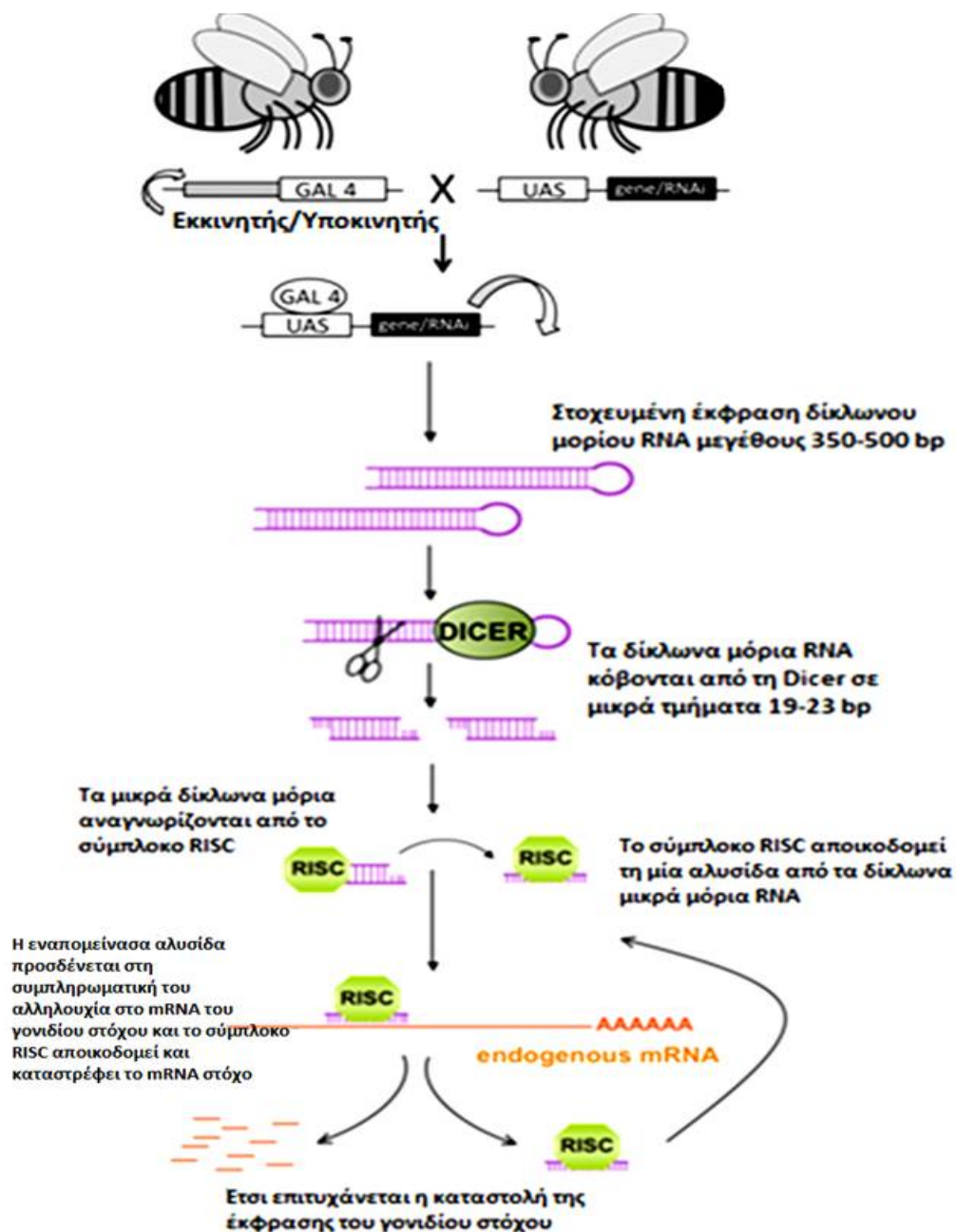
Εικόνα 3.1 Ο φορέας pGreen-Hpelican φέρει τον υποκινητή του γονιδίου Hsp70 που περιέχει ένα TATA box (ο μαύρος κύκλος με το βέλος) που ελέγχει το γονίδιο αναφοράς (EGFP). Τα μαύρα κουτιά με την ένδειξη P αντιστοιχούν της τελικές αλληλουχίες του μεταθετού στοιχείου P που είναι απαραίτητες για την ένθεση. Οι κύκλοι με την ένδειξη I αντιπροσωπεύουν της αλληλουχίες του μεταγραφικού μονωτή από το μεταθετό στοιχείο gypsy. Το λευκό ορθογώνιο με την ένδειξη MCS αντιπροσωπεύει την αλληλουχία πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης.



Εικόνα 3.2 Διαγονιδιακά έντομα. Τα έντομα αυτά φέρουν το γονίδιο GFP υπό τον έλεγχο α) του υποκινητή του γονιδίου *gstD1* ο οποίος περιέχει ένα στοιχείο αντιοξειδωτικής απόκρισης (Antioxidant Response Element-ARE) (prot#7), β) ίδια διαγονιδιακή κατασκευή με το α) μόνο που το ARE φέρει μία μεταλλαγή (prot#8) και γ) τεσσάρων συνθετικών AREs (prot#13). Παρουσία οξειδωτικού στρες οι μεταγραφικοί παράγοντες που προσδένονται στο στοιχείο ARE επάγουν την έκφραση της πρωτεΐνης GFP.

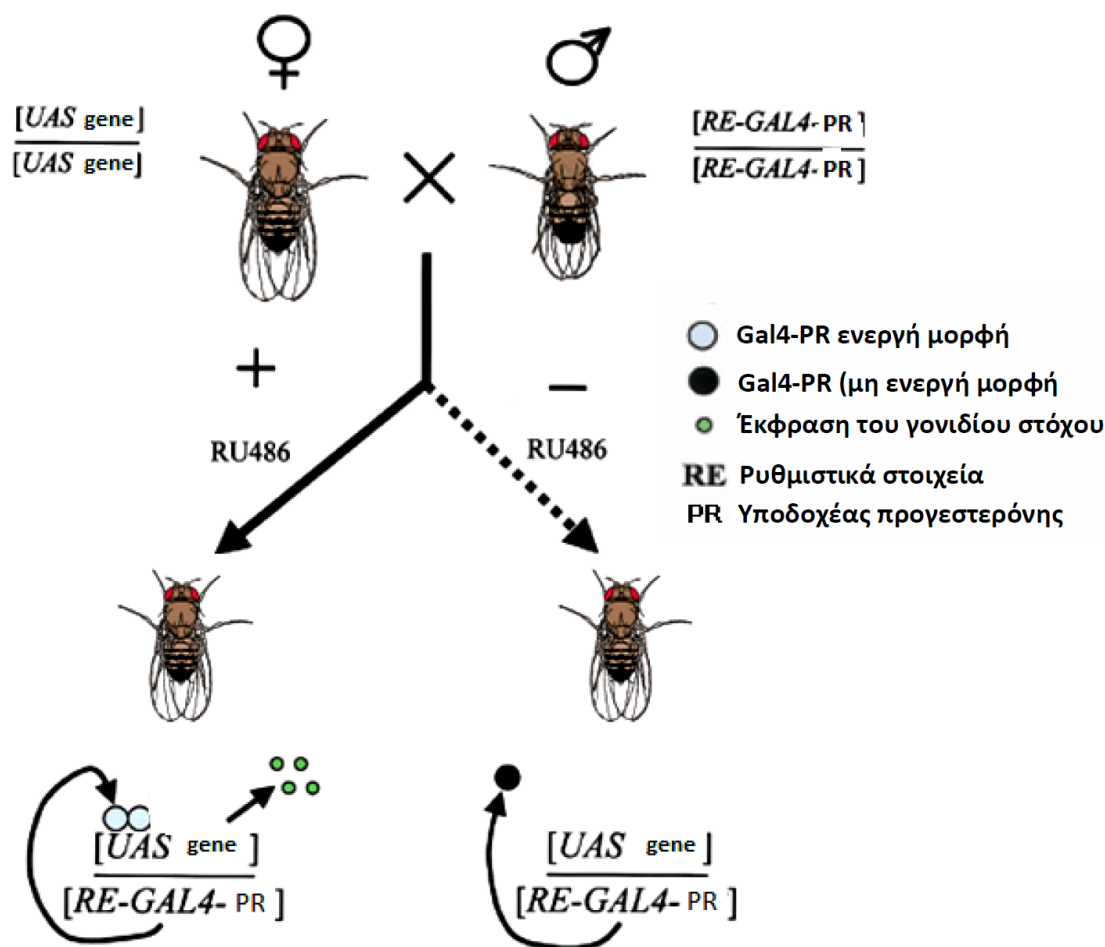
- Διαγονιδιακά έντομα που υπερεκφράζουν την κωδική αλληλουχία του CncC, καθώς και διαγονιδιακά έντομα με επαγόμενη μείωση της έκφρασης των πρωτεϊνών CncC, Keap1 μέσω RNAi (προσφορά των Sykiotis και Bohmann, University of Rochester, NY).
- Διαγονιδιακά έντομα με επαγόμενη μείωση της έκφρασης της καθεψίνης D (CathD), καθώς και των πρωτεασωμικών υπομονάδων β1, β5, α4, α7, Rpn11, Rpn10, Rpn6 και Rpt6 μέσω RNAi (Bloomington Stock Center, USA).

Παρακάτω στην Εικ. 3.3 περιγράφεται ο μηχανισμός αποσιώπησης της έκφρασης του γονιδίου στόχου μέσω RNAi.



Εικόνα 3.3 Ο μηχανισμός αποσίωπησης της έκφρασης του γονιδίου στόχου μέσω της παρεμβολής RNA (RNA interference-RNAi). Αρχικά διασταυρώνεται ένα στέλεχος που υπερεκφράζει τον μεταγραφικό παράγοντα GAL4 με ένα στέλεχος που φέρει τμήμα του γονιδίου στόχου, το οποίο όταν υπερεκφραστεί σχηματίζει δομή φουρκέτας, υπό τον έλεγχο της αλληλουχίας UAS (Upstream Activating Sequence). Ως αποτέλεσμα στους απόγονους της διασταύρωσης θα υπερεκφραστεί η φουρκέτα RNA (που έχει δίκλινη μορφή) του γονιδίου στόχου, η οποία φθάνει συνήθως σε μέγεθος 350-500 bp. Τα δίκλινα τμήματα RNA αναγνωρίζονται από την πρωτεΐνη Dicer, η οποία τα αποικοδομεί σε μικρότερα τμήματα μεγέθους 19-23 bp. Τα μικρά δίκλινα μόρια αναγνωρίζονται από το σύμπλοκο RISC, που αποικοδομεί τη μία αλυσίδα από τα δίκλινα μικρά μόρια RNA. Η εναπομείνουσα αλυσίδα προσδένεται στη συμπληρωματική της αλληλουχία (mRNA του γονιδίου στόχου), οπότε το σύμπλοκο RISC αποικοδομεί και καταστρέφει το mRNA επιτυγχάνοντας έτσι την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου στόχου (Tijsterman και Plasterk, 2004).

- Επίσης, χρησιμοποιούνται τα διαγονιδιακά έντομα tubulin-GeneSwitch-Gal4 (προσφορά των Sykietis και Bohmann, University of Rochester, NY), ως «οδηγοί» (drivers), που υπερεκφράζουν μια πρωτεΐνη χίμαιρα. Η πρωτεΐνη αυτή διαθέτει δυνατότητα πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Gal4, καθώς και τη δομή ενεργοποίησης της μεταγραφής του υποδοχέα της προγεστερόνης (RU486). Ο συγκεκριμένος «οδηγός» προκαλεί επαγόμενη έκφραση του διαγονιδίου σε όλο το σώμα του εντόμου μετά από τη λήψη της ορμόνης RU486 σε συγκέντρωση 320 μM (Εικ. 3.4).



Εικόνα 3.4 Ο μηχανισμός της επαγόμενης έκφρασης του γονιδίου στόχου μέσω της ορμόνης RU486. Διασταυρώνεται ένα στέλεχος που υπερεκφράζει μια πρωτεΐνη χίμαιρα GAL4 [δηλαδή η πρωτεΐνη διαθέτει τη δομή πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Gal4, καθώς και τη δομή ενεργοποίησης της μεταγραφής του υποδοχέα της προγεστερόνης (PR) σε όλο το σώμα του εντόμου] με ένα στέλεχος που φέρει τμήμα του γονιδίου στόχου υπό τον έλεγχο της αλληλουχίας UAS (Upstream Activating Sequence). Οι απόγονοι αυτής της διασταύρωσης θα υπερεκφράζουν το γονίδιο στόχο μόνο μετά τη λήψη της ορμόνης RU486 (Duffy, 2002).

- Τέλος, χρησιμοποιείται το διαγονιδιακό στέλεχος που προκαλεί καταστολή της έκφρασης ενός «non fly gene», συγκεκριμένα του *mcherry* ως στέλεχος μάρτυρας για τα διαγονιδιακά στελέχη του πρωτεασώματος (Bloomington Stock Center, USA).

Η καλλιέργεια των εντόμων πραγματοποιείται σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 23-25°C, με υγρασία 60% και δωδεκάωρη εναλλαγή φωτισμού. Στις μελέτες μας χρησιμοποιήθηκαν επίσης οι πρωτεασωμικοί αναστολείς PS-341, MG-132 και Erochomicin, οι οξειδωτικοί παράγοντες t-BHP, H₂O₂ και Paraquat, καθώς και ο αντιοξειδωτικός παράγοντας Tiron σε συγκεντρώσεις όπως αναγράφεται στην παράθεση των αποτελεσμάτων. Οι παραπάνω ουσίες προστίθενται κατευθείαν στη τροφή των εντόμων. Ως τροφή μάρτυρας σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιείται τροφή με την προσθήκη ίδιας συγκέντρωσης του διαλύτη κάθε ουσίας.

3.1.4.1 Η τροφή των εντόμων

Η **κανονική τροφή** (standard medium) των εντόμων είναι η εξής (μία δόση, ~44 σωλήνες καλλιέργειας):

- 4g άγαρ, 13g μαγιά, 16g ζάχαρη, 25g τοματοπολτός, 32g ριζάλευρο, 2ml αιθανόλη 100%, 2ml προπιονικό οξύ, 450ml H₂O βρύσης

Ογκομετρούμε 450 ml H₂O. Παίρνουμε λίγη ποσότητα νερού από τα 450 ml και διαλύουμε τη μαγιά και τον τοματοπολτό. Έπειτα, βράζουμε το υπόλοιπο H₂O και προσθέτουμε το άγαρ, τη διαλυμένη μαγιά και τη ζάχαρη. Αφήνουμε την τροφή να πάρει άλλη μία βράση και προσθέτουμε τον τοματοπολτό. Σβήνουμε τη φωτιά, ρίχνουμε σιγά σιγά το ριζάλευρο ανακατεύοντας διαρκώς και προσθέτουμε την αιθανόλη και το προπιονικό οξύ. Τέλος, μετά τη στερεοποίηση της τροφής (θερμοκρασία δωματίου) σε πλαστικά σωληνάκια καλλιέργειας μιας χρήσης, σε κάθε σωλήνα προστίθεται μία σταγόνα αιθανόλης και μία σταγόνα προπιονικού οξέος.

Τροφή με ζαχαρόνερο :

- 20g σε 100 ml H₂O βρύσης

Τοποθετείται ένα κομμάτι διηθητικό χαρτί στον πάτο του σωλήνα καλλιέργειας και το βρέχουμε μέχρι να υγρανθεί ελαφρώς με το ζαχαρόνερο.

3.1.5 Διαδικασία παρασκευής της τροποποιημένης με σάκχαρο αλβουμίνης του ορού [BSA (Bovine serum albumin)] [Advanced Glycation End-modified BSA (AGE-modified BSA)] και της συνθετικής λιποφουσκίνης

Η παρασκευή των AGEs (D-Glucose-, D-fructose- και D-ribose)-modified BSA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Stolzing et al. (2006) (τα συγκεκριμένα αντιδραστήρια παρασκευάστηκαν στη Γερμανία από το συνεργαζόμενο εργαστήριο του Καθηγητή Tilman Grune, *Department of Nutritional Toxicology, Friedrich Schiller*

University Jena). Συγκεκριμένα, BSA ελεύθερη από λιπαρά οξέα και ενδοτοξίνες διαλύεται σε διάλυμα 0.5 M PBS, pH 7.4 που περιέχει σάκχαρο σε συγκέντρωση 250 mM. Ακολουθεί αποστείρωση με υπερδιήθηση και επώαση στους 37°C για έξι εβδομάδες. Η περίσσεια των σακχάρων απομακρύνεται με διάλυση σε PBS για 24 ώρες και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ποσοτικοποιείται με τη μέθοδο Bradford. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται αποτελούνται από 1 mmol σάκχαρου ανά 1 mg BSA σε PBS.

Η συνθετική λιποφουσκίνη παρασκευάστηκε μετά από ακτινοβόληση UV της ημιδιαπερατής εξωτερικής δομής ερυθρών αιμοσφαιρίων (erythrocytes ghosts), όπως περιγράφεται στην αναφορά Hohn et al. (2010). Συγκεκριμένα, μετά από πολλαπλά πλυσίματα των ερυθροκυττάρων, γίνεται λύση σε υποτονικό διάλυμα, ομογενοποίηση σε PBS και απομόνωση των ερυθροκυτταρικών μεμβρανών (η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε στους 4°C). Ακολουθεί η ποσοτικοποίηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου με τη μέθοδο Bradford και παρασκευάζεται διάλυμα πρωτεΐνης με συγκέντρωση 3 mg/ml. Το πρωτεϊνικό διάλυμα από τις ερυθροκυτταρικές μεμβράνες τοποθετείται σε τρυβλία Petri τα οποία ακτινοβολούνται είτε με 100 J/cm² UVA είτε με 50 J/cm² UVB. Ανάμεσα στις ακτινοβολήσεις πραγματοποιείται προσθήκη νερού στα τρυβλία (όταν χρειάζεται) λόγω της εξάτμισης του νερού που προϋπάρχει στο διάλυμα, καθώς και μέτρηση του αυτοφθορισμού στα εξής τρία μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής: 360 nm διέγερση/460 nm εκπομπή, 360 nm διέγερση/590 nm εκπομπή και 360 nm διέγερση/460 nm εκπομπή. Η ακτινοβόληση ολοκληρώνεται, όταν ο φθορισμός φτάσει σε ένα σημείο κορεσμού (fluorescence plateau).

Στα πειράματα με τα συνθετικά AGEs και τη συνθετική λιποφουσκίνη στην τροφή των εντόμων μάρτυρες (controls), προστίθεται φρέσκο διάλυμα BSA (Bovine serum albumin) ή απεσταγμένο νερό, αντίστοιχα. Η συγκέντρωση των AGEs ήταν 0,25 mmol σάκχαρο-0,25 mg BSA (3,76 μM σάκχαρο-τροποποιημένης BSA) ανά ml τροφής. Η συγκέντρωση της λιποφουσκίνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0,1 mg/mL.

3.1.6 Κυτταροκαλλιέργειες

3.1.6.1 Διατήρηση και ανακαλλιέργεια των κυττάρων

Χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά ανθρώπινου οστεοσαρκώματος, U-2 OS (American Tissue Culture Collection), η οποία καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM) εμπλουτισμένο με 2 mM L-γλουταμίνη και 10% (v/v) ορό εμβρύου βοός (FBS, fetal bovine serum) σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37°C, υγρασίας 95% και ατμόσφαιρας CO₂ 5%. Τα κύτταρα, όταν καλύψουν τον πυθμένα της φλάσκας ή του τρυβλίου κυτταροκαλλιέργειας ανακαλλιεργούνται, καθώς η ανάπτυξή τους περιορίζεται λόγω επαφής. Ειδικότερα, για τη διαδικασία της τρυψινοποίησης, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση και τα κύτταρα εκπλένονται με διάλυμα PBS, ώστε να

απομακρυνθούν τα υπολείμματα ορού που περιέχουν αναστολείς της τρυψίνης. Έπειτα, τα κύτταρα επωάζονται με διάλυμα τρυψίνης/EDTA στους 37°C, έως ότου συρρικνωθούν• ακολούθως, απομακρύνεται όλη η ποσότητα του διαλύματος και η αποκόλληση των κυττάρων γίνεται με ήπια μηχανική ανατάραξη της φιάλης ή του τρυβλίου καλλιέργειας. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε νέο θρεπτικό υλικό με επανειλημμένες ήπιες αναρροφήσεις και μοιράζονται σε νέες φιάλες ή τρυβλία με λόγο κατανομής (spit ratio) 1:8.

3.1.6.2 Αποθήκευση των κυττάρων

Σύμφωνα με τους Hayflick και Moorhead (Hayflick και Moorhead, 1961), τα διάφορα κυτταρικά στελέχη μπορούν να ψυχθούν στους -196°C για μακρύ χρονικό διάστημα και αφού αποψυχθούν και επανέλθουν στους 37°C, να ανακαλλιεργηθούν και να διατηρήσουν στο ακέραιο τις ιδιότητές τους.

Για την αποθήκευση των κυττάρων γίνεται θρυψινοποίηση και επαναιώρησή τους σε υλικό αποτελούμενο από 40% DMEM, 50% ορό και 10 % (v/v) DMSO. Το DMSO έχει κρυοπροστατευτικό ρόλο, καθώς περιορίζει τη δημιουργία κρυστάλλων προστατεύοντας έτσι τα κύτταρα κατά τη διαδικασία ψύξης-απόψυξης. Συγκεκριμένα, η μείωση του σημείου πήξης που προκαλεί το DMSO εμποδίζει τη δημιουργία κρυστάλλων (Dilley et al., 2003; Adams, 1980). Τέλος, το εναιώρημα των κυττάρων προστίθεται σε αποστειρωμένα φιαλίδια πολυπροπυλενίου. Μια άλλη σημαντική παράμετρος της διαδικασίας αυτής είναι η ταχύτητα ψύξης-απόψυξης. Προκειμένου τα κύτταρα να προστατευτούν περαιτέρω από τις βλαβερές συνέπειες της ψύξης, πρέπει η ψύξη να είναι σταδιακή για ~1 ώρα στους -20°C• η οποία ακολουθείται από 24 ώρες στους -80°C και, τέλος, ακολουθεί αποθήκευση σε δεξαμενές Dewar υγρού αζώτου στους -196°C.

Η απόψυξη των κυττάρων (αντίθετα με την ψύξη που γίνεται σταδιακά) πρέπει να είναι ταχεία, ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία βλαβών από τους κρυστάλλους που ενδεχομένως σχηματίζονται στα κύτταρα κατά την ψύξη. Συνεπώς, το φιαλίδιο με τα κύτταρα τοποθετείται απευθείας από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο στους 37°C και ακολούθως, το εναιώρημα των κυττάρων προστίθεται σε φιάλη ή τρυβλίο καλλιέργειας που ήδη περιέχει θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με ορό. Αφού ολοκληρωθεί η προσκόλληση των κυττάρων (την επόμενη ημέρα) το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας αντικαθίσταται με νέο, προκειμένου να απομακρυνθεί το DMSO, το οποίο είναι τοξικό για τα κύτταρα.

Προκειμένου να μελετηθούν οι κυτταρικές μεταβολές μετά από την αναστολή του πρωτεασώματος, ίσος αριθμός κυττάρων επώαστηκε με 25 nM PS-341 εις διπλούν για 2-8 ώρες. Τα κύτταρα μάρτυρες επώαστηκαν με το διαλύτη του πρωτεασωμικού αναστολέα PS-341.

3.1.7 Διαλύματα

Διάλυμα Ringer's	0,75% NaCl (w/v), 0,02% CaCl (w/v), 0,01% KCl (w/v), 0,02% NaHCO ₃ (w/v) σε dH ₂ O
Διάλυμα λύσης NP-40	150 mM NaCl, 1% NP-40 (v/v), 50 mM Tris, pH 8.0 σε dH ₂ O
Διάλυμα 1X TBS	20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7.6 σε dH ₂ O
Διάλυμα stripping	50 mM Tris, 2 % SDS (w/v), pH 7.0 σε dH ₂ O
Διάλυμα λύσης 26S	0,2 % NP-40 (v/v), 5 mM ATP, 10 % γλυκερόλη (v/v), 20 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DDT, 20 mM Tris, pH 7.6 σε dH ₂ O
Διάλυμα λύσης 20S	0,5 % Triton X-100 (v/v), 250 mM NaCl, 3 mM EDTA, 3 mM EGTA, 20 mM Tris, pH 7.6 σε dH ₂ O
Διάλυμα αντίδρασης για τη μέτρηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας	100 mM Hepes, pH 7.4 σε dH ₂ O
Διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης για τη μέτρηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας	30 mM CH ₃ COONa, 70 mM CH ₃ COOH, 100 mM ClCH ₂ COONa, pH 5.3 σε dH ₂ O
Διάλυμα απομόνωσης μιτοχονδρίων	0.32 M σουκρόζη, 10 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH 7.3 σε dH ₂ O
Διάλυμα αντίδρασης για τη μέτρηση της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης	0,42 mM ινδοφαινόλη, 0,014 M ηλεκτρικό οξύ, 0,084 M σουκρόζη, 1,4 mM KCN σε dH ₂ O
Διάλυμα αντίδρασης για τη μέτρηση της ενεργότητας του μιτοχονδριακού συμπλέγματος II/III	40 mM φωσφορικό νάτριο, 20 mM ηλεκτρικό οξύ, 3,75 μM ροτενόνη, 2 mM KCN, 0,5 mM EDTA, pH 7.4 σε dH ₂ O
Διάλυμα αντίδρασης για τη μέτρηση της ενεργότητας των καθεψινών B και L	50 mM οξικό νάτριο, 8 mM υδροχλωρική κυστεΐνη, 1 mM EDTA, pH 5.0 σε dH ₂ O

3.2 Μέθοδοι

Προκειμένου να εντοπίσουν τυχόν φυλετικές ή ιστικές διαφοροποιήσεις κατά τη γήρανση, αρσενικά και θηλυκά άτομα διαμελίστηκαν και συλλέχθηκαν δείγματα από κεφάλια (head-H), θώρακες (thorax-T) και κοιλίες (abdomen-A), καθώς και από ωοθήκες (ovaries-OV) και σπερματοθήκες (spermathecae- SP). Ακόμα μελετήθηκαν και λάρβες 2^{ου} και 3^{ου} σταδίου, καθώς και συνολικά οι σωματικοί ιστοί του εντόμου, δηλαδή συλλέχθηκε

ολόκληρο το σώμα του εντόμου μετά από αφαίρεση του αναπαραγωγικού συστήματος (ωοθήκες ή σπερματοθήκες).

Οι ηλικιακές ομάδες που μελετήθηκαν μετά από εκτεταμένα προκατακτικά πειράματα μακροβιότητας, ήταν οι εξής:

Νεαρά έντομα, 1-5 ημερών (Young-Y), Μέσης ηλικίας έντομα, 30-36 ημερών (Middle age-M) και Γηρασμένα έντομα [θηλυκά >54 ημερών ή αρσενικά >45 ημερών (Old-O)]. Η διαφορά αυτή οφείλεται στο ότι τα θηλυκά έντομα έχουν μεγαλύτερο χρόνο ζωής από τα αρσενικά έντομα (Τσακίρη, 2010).

3.2.1 Ανατομία ωοθηκών και σπερματοθηκών του εντόμου *Drosophila melanogaster*

3.2.1.1 Ανατομία ωοθηκών

Συλλέχθηκαν θηλυκά έντομα από κάθε ηλικιακή ομάδα και αναισθητοποιήθηκαν με αιθέρα ή με ειδικό σύστημα νάρκωσης με CO₂. Με τη βοήθεια λεπτών λαβίδων ανατομίας πιέζεται το έντομο ακριβώς κάτω από το θώρακα και τοποθετείται σε ειδική αντικειμενοφόρο *vidal* η οποία περιέχει διάλυμα Ringer's. Το διάλυμα Ringer's είναι ένα ισότονο διάλυμα για την αποφυγή ωσμωτικών φαινομένων και φυλάσσεται στους 4°C. Με μία άλλη λαβίδα πιάνεται η άκρη της κοιλιάς του εντόμου και τραβιέται με λεπτές κινήσεις, ώστε να βγουν οι ωοθήκες.

3.2.1.2 Ανατομία σπερματοθηκών

Η διαδικασία είναι ίδια με την ανατομία των ωοθηκών των θηλυκών εντόμων (βλέπε 3.2.1.1).

3.2.2 Δοκιμή γευστικότητας

Ο έλεγχος του ρυθμού λήψης τροφής του εντόμου μετά από την προσθήκη κάποιας ουσίας στην τροφή πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην εργασία Bahadorani S. και Hilliker A.J (2008). Ειδικότερα, νεαρά έντομα τοποθετούνται σε σωλήνα καλλιέργειας που περιέχει διηθητικό χαρτί ποτισμένο μόνο με νερό βρύσης για 20 ώρες και στη συνέχεια μεταφέρονται σε τροφή που περιέχει την προς μελέτη ουσία μαζί με 0,2% sulforhodamine B sodium salt (Acid-Red) για 2 ώρες σε σκοτεινό μέρος. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε τροφή που περιείχε το διαλύτη των ουσιών μαζί με 0,2% sulforhodamine B sodium salt (Acid-Red). Στη συνέχεια, τα έντομα παρατηρούνται σε στερεοσκόπιο και η κοιλιακή ερυθρότητα βαθμονομείται από 0 (άχρωμη κοιλιά, μη λήψη τροφής) μέχρι 5 (έντονη κόκκινη κοιλιά, κανονική λήψη τροφής).

3.2.3 Έλεγχος της κινητικότητας των εντόμων

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της κινητικότητας του εντόμου είναι σύμφωνα με τους Vernace et al (2007). Ειδικότερα, 30 έντομα (15 θηλυκά και 15 αρσενικά) που πρόκειται να εξεταστούν αναισθητοποιούνται με αιθέρα ή CO₂ και τοποθετούνται μέσα σε ένα ογκομετρικό κύλινδρο των 100 ml κλεισμένο ελαφρώς με ένα βαμβάκι. Αφήνονται τα έντομα να ανακτήσουν πλήρως τις αισθήσεις τους (περίπου 20 λεπτά) και έπειτα, με ένα ελαφρύ χτύπημα κατεβαίνουν στον πάτο του κυλίνδρου. Στη συνέχεια καταγράφουμε πόσα άτομα θα περάσουν το όριο των 66 ml σε χρόνο 20 δευτερολέπτων. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 5 φορές.

3.2.4 Έλεγχος της βιωσιμότητας των εντόμων

Για τον έλεγχο του προσδόκιμου ζωής των εντόμων, ίσος αριθμός θηλυκών και αρσενικών εντόμων συλλέγονται (τουλάχιστον 40 θηλυκά και 40 αρσενικά έντομα) και καλλιεργούνται σε σωλήνες καλλιέργειας. Τα έντομα μεταφέρονται σε φρέσκια τροφή κάθε 3-4 μέρες με καθημερινή καταγραφή της θνησιμότητας. Για τη δημιουργία των καμπυλών βιωσιμότητας χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Kaplan-Meier, καθώς και η στατιστική ανάλυση log-Rank (Mantel-Cox).

3.2.5 Απομόνωση αιμολέμφου από ενήλικα έντομα

Ενήλικα έντομα αναισθητοποιούνται (τουλάχιστον 30-40 έντομα) και με μία λεπτή λαβίδα ανατομίας προκαλείται ένα ελαφρύ τρύπημα στο θώρακα προκειμένου να δημιουργηθεί μια πληγή. Τα έντομα τοποθετούνται αμέσως σε σωληνάριο eppendor που περιέχει ένα φίλτρο από υαλοβάμβακα και ακολουθεί φυγοκέντρηση για περίπου 1 λεπτό στα 19.000 xg, προκειμένου η αιμολέμφος να εξαχθεί από τα έντομα και να μπορέσουμε να τη συλλέξουμε (5-8 μ l). Ακολουθεί ποσοτικοποίηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου με τη μέθοδο Bradford.

3.2.6 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα εκχυλίσματα προσδιορίζεται με τη μέθοδο Bradford. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη δέσμευση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue στα βασικά κυρίως αμινοξέα των πρωτεϊνών. Η δέσμευση είναι ανάλογη της ποσότητας της πρωτεΐνης και μετατοπίζει το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης της χρωστικής από τα 470 nm στα 595 nm. Το χρώμα του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής είναι σταθερό για μια ώρα περίπου και έχει υψηλό μοριακό συντελεστή απορρόφησης που συνεπάγεται υψηλή ευαισθησία στις ποσοτικές μετρήσεις πρωτεϊνικών δειγμάτων. Με τη βοήθεια διαλυμάτων BSA γνωστών συγκεντρώσεων, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη, από την οποία

υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνη. Η οπτική πυκνότητα στα 590 nm μετράται σε φωτόμετρο.

3.2.7 SDS PAGE – Ανοσοστύπωμα (Western)

Οι σωματικοί ιστοί, οι γονάδες ή τα κύτταρα ομογενοποιούνται με διάλυμα λύσης NP-40 που περιέχει αναστολέα των πρωτεασών. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στα 19,000 xg (4°C), συλλογή του υπερκείμενου και προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Ακολουθεί ανάλυση των πρωτεϊνών σε ομοιογενές πήκτωμα 12% ακρυλαμίδης, μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και στη συνέχεια επώαση της μεμβράνης για 50 λεπτά με διάλυμα κάλυψης των μη ειδικών θέσεων [5% γάλα με χαμηλά λιπαρά διαλυμένο σε 1X TBS παρουσία 0,1 % Tween-20] σε θερμοκρασία δωματίου. Το πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα [φέρει συνδεδεμένη την υπεροξειδάση του ραπανακιού (Horseradish peroxidase-HRP)] διαλύονται σε διάλυμα κάλυψης μη ειδικών θέσεων και επωάζονται με την νιτροκυτταρίνη για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Πραγματοποιούνται 3 πλυσίματα μετά τις επώσεις με τα αντισώματα με το διάλυμα 1X TBS, 0,1 % Tween-20. Η ανίχνευση του συμπλόκου αντιγόνου (πρωτεΐνη υπό μελέτη)-αντισώματος έγινε με τη μέθοδο ECL (Santa Cruz Biotechnology) και τη χρήση H₂O₂ και λουμινόλης ως ενισχυτή χημειοφωταύγειας. Η χημειοφωταύγεια αποτυπώνεται σε φιλμ αυτοραδιογραφίας και η εμφάνιση του φιλμ πραγματοποιείται με τη μεταφορά του σε διάλυμα εμφάνισης (developer) για περίπου 1 έως 5 λεπτά. Ακολουθεί ξέπλυμα σε H₂O βρύσης και μονιμοποίηση σε διάλυμα Fixer για 5 έως 10 λεπτά. Τέλος, το φιλμ ξεπλένεται πολύ καλά με H₂O βρύσης και στεγνώνει.

Η μεμβράνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ξανά, αφού αφαιρεθούν τα αντισώματα μετά από επώαση με διάλυμα stripping στους 60°C για 45 λεπτά* και αφού ακολουθήσουν 3 πλυσίματα της μεμβράνης με διάλυμα 1X TBS, 0,1 % Tween-20.

Για την ανίχνευση των οξειδωμένων πρωτεϊνών σε πρωτεϊνικό δείγμα χρησιμοποιήθηκε το OxyBlot kit (Chemicon) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στη συνέχεια, ακολουθεί η διαδικασία του SDS PAGE-Ανοσοστυπώματος με το ειδικό αντίσωμα anti-DNP (ειδικό έναντι καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών).

3.2.8 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεασωμάτων

Σωματικοί ιστοί ή απομονωμένες ωσθήκες ομογενοποιούνται σε διάλυμα λύσης που περιέχει αναστολείς των πρωτεασών. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται σε 19.000 xg στους 4°C για 10 λεπτά και στη συνέχεια ίση ποσότητα ολικής πρωτεΐνης επωάζεται με σφαιρίδια πρωτεΐνης-A σεφαρόζης (υπό ανάδευση, για 1 ώρα στους 4°C). Στη συνέχεια προστίθενται 2 μg πρωτογενές αντίσωμα και το διάλυμα επωάζεται υπό ανάδευση στους 4°C για όλη τη

νύχτα (overnight, O/N). Την επόμενη μέρα, προστίθενται σφαιρίδια πρωτεΐνης-A, πάλι υπό ανάδευση για 2 ώρες στους 4°C. Το ανοσοκατακρημνισμένο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα συλλέγεται και ξεπλένεται 3 φορές με διάλυμα πλύσης (50 mM Tris pH 8.0). Τέλος, τα σφαιρίδια σεφαρόζης αφαιρούνται με βράσιμο για 3 λεπτά σε αναγωγικό διάλυμα (reducing Laemmli buffer) και το πρωτεϊνικό διάλυμα αναλύεται με SDS-PAGE και ανοσοστόπωμα (3.2.7). Ως μάρτυρες, χρησιμοποιούνται φυσιολογικά IgGs ή σφαιρίδια πρωτεΐνης-A σεφαρόζης.

3.2.9 Ανοσοϊστοχημεία πρωτεασώματος σε τομές από ολόκληρα έντομα

Τα έντομα αναισθητοποιούνται και μετά από αφαίρεση των φτερών και των ποδιών, μονιμοποιούνται σε διάλυμα 4% φορμαλδεΐδης για 24 ώρες. Τα μονιμοποιημένα έντομα εμποτίζονται και εγκλείονται σε παραφίνη σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Kucherenko et al. (2010). Για την ανοσοϊστοχημεία του πρωτεασώματος, αρχικά αφαιρείται η παραφίνη από τις τομές πάχους 4 μM ολόκληρων εντόμων μετά από επώαση με ξυλόλη και ενυδάτωση με την εμβάπτιση σε διαδοχικά διαλύματα αιθανόλης (από το πιο πυκνό διάλυμα στο πιο αραιό). Ακολουθεί η αποκάλυψη των αντιγόνων με θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων σε 10 mM διάλυμα κιτρικού οξέος για 25 λεπτά και αδρανοποίηση της ενδογενούς υπεροξειδάσης με εμβάπτιση σε διάλυμα 3% H₂O₂ διαλυμένο σε TBS για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, οι τομές επωάζονται με το πρωτογενές αντίσωμα έναντι των υπομονάδων α (anti-20S-α, Santa Cruz Biotechnology) του πρωτεασώματος (σε αραίωση 1:100) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (Room temperature, RT). Οι θέσεις πρόσδεσης του πρωτογενούς αντισώματος στη συνέχεια ανιχνεύονται χρησιμοποιώντας το σύστημα EnVision Plus (Dako). Χρησιμοποιήθηκε 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Dako) για την αποκάλυψη του σήματος και διάλυμα αιματοξυλίνης για την χρώση των πυρήνων (counterstaining). Οι τομές παρατηρήθηκαν σε φωτονικό μικροσκόπιο με ψηφιακή κάμερα (DFC320; Leica) και οι φωτογραφίες συλλεχθηκαν με το πρόγραμμα Application Suite (version 2.2; Leica). Ως αρνητικοί μάρτυρες εξετάστηκαν τομές οι οποίες δεν επώαστηκαν με πρωτογενές αντίσωμα.

3.2.10 Μέτρηση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS assay)

Οι ιστοί ή τα κύτταρα συλλέγονται σε 200 μl PBS (εις διπλούν το κάθε δείγμα). Στη συνέχεια, προστίθεται η χρωστική DCF-DA (Invitrogen) διαλυμένη σε PBS (200 μl) σε συγκέντρωση 10 μM. Ακολουθεί ανάδευση (vortex) για κάθε δείγμα και επώαση (30 λεπτά) στους 25°C για τους ιστούς και 37°C για τα κύτταρα στο σκοτάδι. Στη συνέχεια, αφαιρείται η χρωστική και ακολουθεί επώαση για 20 λεπτά με 200 μl φρέσκο PBS. Τα δείγματα ξεπλένονται δύο φορές με φρέσκο PBS και ομογενοποιούνται με διάλυμα λύσης NP-40 που περιέχει αναστολέα των πρωτεασών. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις

19.000 xg (4°C)• συλλέγεται το υπερκείμενο και ακολουθεί η ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Τέλος, στο υπερκείμενο προστίθεται dH₂O μέχρι το 1 ml και στη συνέχεια καταγράφεται ο εκπεμπόμενος φθορισμός με τη χρήση ειδικού φθορομέτρου (VersaFluor TM Fluorometer System, Biorad)• χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα με μήκος κύματος διέγερσης (Excitation) 490 nm και μήκος κύματος εκπομπής (Emission) 520 nm. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται δείγμα που περιέχει τη χρωστική, αλλά όχι πρωτεΐνη. Η κανονικοποίηση πραγματοποιείται ως προς την ολική ποσότητα πρωτεΐνης (input).

3.2.11 Μέτρηση των τροποποιημένων πρωτεϊνών και λιπιδίων με σάκχαρα (Advanced Glycation End products-AGEs)

Για τη μέτρηση των AGEs με φθορισμομετρία οι ιστοί ομογενοποιούνται σε διάλυμα 900 μl PBS, 10 mM EDTA. Στη συνέχεια προστίθεται τρυψίνη σε συγκέντρωση 1 mg/ml. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 24 ώρες φυγοκέντρηση στα 11.000 xg για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και συλλογή του υπερκειμένου (900 μl). Τέλος, με τη χρήση του φθορισμομέτρου (VersaFluor TM Fluorometer System, Biorad) και με φίλτρα μήκους κύματος διέγερσης (Excitation) 360/40 nm και μήκους κύματος εκπομπής (Emission) 440/10 nm καταγράφεται ο φθορισμός. Ο μηδενισμός του φθορισμομέτρου γίνεται με το δείγμα που περιέχει PBS/10 mM EDTA και 1 mg/ml τρυψίνη, χωρίς πρωτεΐνη.

3.2.12 Μέτρηση της πρωτεΐνης GFP (Green Fluorescent Protein) με φθορισμομετρία

Οι σωματικοί ή οι αναπαραγωγικοί ιστοί (ωοθήκες, σπερματοθήκες) από τα διαγονιδιακά έντομα που φέρουν το γονίδιο GFP υπό τον έλεγχο ενός υποκινητή που φέρει είτε ένα στοιχείο αντιοξειδωτικής απόκρισης (ARE), είτε ένα μεταλλαγμένο ARE ή 4 συνθετικά ARE (βλέπε παραπάνω) συλλέγονται σε 1 ml NP-40 διάλυμα λύσης που περιέχει αναστολέα των πρωτεασών. Ακολουθεί ομογενοποίηση στο σκοτάδι και φυγοκέντρηση στα 19.000 xg για 10 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο (900 μl) συλλέγεται και το πρωτεϊνικό περιεχόμενο ποσοτικοποιείται με τη μέθοδο Bradford. Η μέτρηση του φθορισμού στο φθορισμόμετρο (VersaFluor TM Fluorometer System, Biorad) γίνεται με φίλτρα διέγερσης (Excitation) 490 nm και εκπομπής (Emission) 510 nm. Το φθορισμόμετρο μηδενίζεται με το δείγμα από έντομα αγρίου τύπου, καθώς οι ιστοί των εντόμων εμφανίζουν αυτοφθορισμό. Η κανονικοποίηση έγινε ως προς την ολική ποσότητα πρωτεΐνης.

3.2.13 Αντίστροφη μεταγραφή mRNA (παραγωγή cDNA)

Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις RT-PCR προκειμένου να ελεγχθούν τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων: *rpn11*, *rpn6* (κωδικοποιούν για τις ρυθμιστικές υπομονάδες Rpn11 και Rpn6 του 19S πρωτεασώματος), *a4* και *a7* (κωδικοποιούν για τις A4

και A7 ρυθμιστικές υπομονάδες του 20S πρωτεασώματος), $\beta 1$, $\beta 2$ και $\beta 5$ (κωδικοποιούν για τις καταλυτικές υπομονάδες $\beta 1$, $\beta 2$ και $\beta 5$ του 20S πρωτεασώματος), *atg6* και *atg8* (κωδικοποιούν για τις αυτοφαγικές πρωτεΐνες Atg6 και Atg8), *cncC* (κωδικοποιεί για τον μεταγραφικό παράγοντα αντιοξειδωτικής απόκρισης CncC• το ομόλογο του Nrf2 στη *Drosophila*), *keap1* (κωδικοποιεί για τον παράγοντα Keap1 που δρα ως αναστολέας της δράσης του μεταγραφικού παράγοντα CncC), *gstD1* (κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη GstD1 που εμπλέκεται στο μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης) και τέλος, του γονιδίου αναφοράς *rp49*. Ολικό RNA από σωματικούς ιστούς εντόμων απομονώθηκε χρησιμοποιώντας RNeasy (Molecular Research Center, Inc). Με την ίδια μέθοδο απομονώθηκε ολικό RNA από ωοθήκες ή σπερματοθήκες. Στη συνέχεια παράγεται cDNA από 1 μ g ολικό RNA χρησιμοποιώντας το cDNA synthesis kit της Biorad σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Για την PCR χρησιμοποιείται το Taq Green master mix (promega M7112). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 50 μ l. Η αντίδραση περιέχει 25 μ l GoTaq Green Master Mix (2x), 2 μ l από κάθε εκκινητή (F/R) ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 0,8 μ M, 19 μ l ddH₂O και 2 μ l cDNA

Οι συνθήκες του PCR προγράμματος για το γονίδιο *rp49* είναι:

- 95°C για 2'
- 95°C για 30''
- 50°C για 1' } X 28 κύκλοι
- 72°C για 1' }
- 72°C για 5' }

Οι συνθήκες του προγράμματος για τα άλλα γονίδια είναι:

- 95°C για 2'
- 95°C για 30''
- 58°C για 1' } X 28 κύκλοι
- 72°C για 1' }
- 72°C για 5' }

Στη θερμοκρασία των 95° C πραγματοποιείται η αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων, στη θερμοκρασία των 50° C και 58° C πραγματοποιείται η πρόσδεση των εκκινητών ενώ στους 72° C λαμβάνει χώρα ο πολυμερισμός του DNA από την Taq πολυμεράση. Τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύονται σε πήκτωμα 2 % αгарόζης.

3.2.14 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR, Q-RT-PCR)

Ολικό RNA από σωματικούς ιστούς εντόμων ή από λάρβες 2^{ου} ή 3^{ου} σταδίου απομονώνεται χρησιμοποιώντας RNeasy (Molecular Research Center, Inc). Στη συνέχεια,

παράγεται cDNA από 1 µg ολικό RNA χρησιμοποιώντας το cDNA synthesis kit της Biorad. Η αντίδραση Q-RT-PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμοκυκλοποιητή PikoReal Real-Time (Thermo Scientific), σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master mix της Thermo Scientific. Οι καμπύλες τήξης (Melting curves) εξετάστηκαν μετά το στάδιο του πολλαπλασιασμού του προϊόντος της PCR για την επιβεβαίωση μοναδικών ειδικών προϊόντων. Επίσης, για κάθε ζεύγος εκκινητών πραγματοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη για να βρεθεί η αποτελεσματικότητα της ενίσχυσής τους. Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε είναι το εξής:

- 95°C για 10'
 - 95°C για 15''
 - 60°C για 30''
 - 72°C για 30''
- } X 40 κύκλοι

Οι καμπύλες τήξης δημιουργήθηκαν στους 58-95°C.

3.2.15 Καταγραφή των τριών ενζυμικών πρωτεασωμικών ενεργοτήτων

Οι ιστοί ή τα κύτταρα συλλέγονται είτε στο διάλυμα λύσης 26S (όταν πρόκειται να μετρηθεί η ενεργότητα του 26S πρωτεασώματος) ή στο διάλυμα λύσης 20S (όταν πρόκειται να μετρηθεί η ενεργότητα του 20S πρωτεασώματος)• με τη χρήση των παραπάνω διαλυμάτων απομονώνονται ενεργά πρωτεασώματα. Ακολουθεί ομογενοποίηση, φυγοκέντρωση στα 19.000 xg (4°C) για 10 λεπτά, συλλογή υπερκλειμένου και ποσοτικοποίηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου με τη μέθοδο Bradford. Στη συνέχεια 10 µg πρωτεΐνης επωάζονται για 30 λεπτά (37°C) στο διάλυμα αντίδρασης (100 mM Hepes, pH 7.4) ξεχωριστά με κάθε ένα από τα τρία φλουοροπεπτίδια CT-L (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC-LLVY), C-L (Z-Leu-Leu-Glu-AMC- LLE) και T-L (Boc-Leu-Arg-Arg-AMC- LRR). Τα πεπτίδια αυτά είναι ειδικά για τις ενζυμικές ενεργότητες των πρωτεασωμικών υπομονάδων β5, β1 και β2, αντίστοιχα. Κατά τη διαδικασία της επώασης το κάθε φλουοροπεπτίδιο αναγνωρίζεται από την αντίστοιχη ενζυματική ενεργότητα του πρωτεασώματος και ειδικότερα το φλουοροπεπτίδιο LLVY από την ενεργότητα χυμοθρυψίνης, που εδράζεται στην υπομονάδα β5, το LLE από την ενεργότητα κασπάσης, που εδράζεται στην υπομονάδα β1 και το LRR από την ενεργότητα θρυψίνης που εδράζεται στην υπομονάδα β2. Παρουσία ενζυμικής ενεργότητας το φλουοροπεπτίδιο αποικοδομείται και παράγεται φθορισμός. Μετά το τέλος του χρόνου επώασης προστίθεται διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης και ο παραγόμενος φθορισμός καταγράφεται στο φθορισμόμετρο (φίλτρο διέγερσης, 350 nm / φίλτρο εκπομπής, 440 nm; VersaFluor™ Fluorometer System, Biorad). Προκειμένου να καθοριστεί ότι η τιμή του φθορισμού που προκύπτει αφορά στην ενεργότητα του πρωτεασώματος, δείγματα μάρτυρες μελετήθηκαν μετά την προσθήκη των ειδικών αναστολέων του πρωτεασώματος MG-132 ή Epoxomicin (ENZO Life Sciences, USA).

3.2.16 Μέτρηση των ενδογενών επιπέδων H₂O₂ σε σωματικούς ιστούς

Τα ενδογενή επίπεδα H₂O₂ σε απομονωμένους ιστούς αναλύονται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της συσκευασίας Amplex Red H₂O₂ (Invitrogen) στο φωτόμετρο SmartSpec™ 3000 (Bio-Rad laboratories) στο μήκος κύματος 560 nm.

3.2.17 Απομόνωση μιτοχονδρίων από σωματικούς ιστούς των εντόμων

Τα μιτοχόνδρια απομονώθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Ferguson et al. (2005) με μικρές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, οι σωματικοί ιστοί από ~30-40 έντομα ομογενοποιήθηκαν σε 300-350 μl κρύο διάλυμα απομόνωσης που περιέχει 2 % (w/v) BSA. Το ομογενοποίημα φιλτράρεται σε ένα στρώμα γάζας και το φίλτρο γάζας ξεπλένεται με διάλυμα απομόνωσης μέχρι να τελικού όγκου 1,5 ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 2.200xg (4°C) και το υπερκείμενο συλλέγεται (κυτοσόλιο-χωρίς μιτοχόνδρια) προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός μάρτυρας. Το ίζημα ξεπλένεται με διάλυμα απομόνωσης χωρίς BSA και επαναδιαλύεται σε 300 μl του ίδιου διαλύματος. Στη συνέχεια, τα μιτοχόνδρια διαλυτοποιούνται σε διάλυμα λύσης NP-40 που περιέχει αναστολέα των πρωτεασών. Οι πρωτεΐνες συλλέγονται μετά από φυγοκέντρηση για 15 λεπτά (19.000xg) (4°C) και αναλύονται με SDS-PAGE και ανοσοστύπωμα Western.

3.2.18 Μέτρηση της ενεργότητας της μιτοχονδριακής ηλεκτρικής αφυδρογονάσης

Για τη μέτρηση της ενεργότητας της ηλεκτρονικής αφυδρογονάσης, 20-60 μg απομονωμένης μιτοχονδριακής πρωτεΐνης διαλύονται σε διάλυμα απομόνωσης χωρίς BSA. Στη συνέχεια το δείγμα προστίθεται στο διάλυμα αντίδρασης και η απορρόφηση καταγράφεται στα 600 nm για διάστημα 5 λεπτών.

3.2.19 Μέτρηση της ενεργότητας του μιτοχονδριακού συμπλέγματος II/III

Η ενεργότητα του συμπλέγματος II/III αναλύεται σύμφωνα με τους Ferguson et al. (2005) με μικρές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, 50 μg μιτοχονδριακής πρωτεΐνης διαλύονται σε 30 mM φωσφορικό νάτριο, pH 7.4 με τελική συγκέντρωση 1 mg/ml. Στη συνέχεια, προστίθεται το διάλυμα αντίδρασης και το ολικό διάλυμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά προκειμένου να ενεργοποιηθεί το ηλεκτρικό οξύ. Ακολούθως προστίθενται 30 μM κυτοχρώματος c (horse heart cytochrome c) και καταγράφεται η απορρόφηση στα 550 nm για 2 λεπτά.

3.2.20 Μέτρηση της ενζυματικής ενεργότητας των καθεψινών B και L

Η ενεργότητα των καθεψινών B και L αναλύεται σύμφωνα με τους Grimm et al. (2012) με μικρές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, σωματικοί ιστοί ή λάρβες 2^{ου} ή 3^{ου} σταδίου

ομογενοποιούνται σε διάλυμα 1 mM dithiothreitol και Tris/HCl 1 M pH 5.0 και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 λεπτά σε 15.000 xg (4°C). Ακολουθεί ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford και στη συνέχεια, 20 µg πρωτεΐνης προστίθενται στο διάλυμα της αντίδρασης. Το μίγμα επώάζεται παρουσία του φλουοροπεπτιδίου z-FR-AMC (Enzo Life Sciences) για 30 λεπτά στους 37°C. Μετά το τέλος της επώασης, καταγράφεται ο παραγόμενος φθορισμός (VersaFluor™ Fluorometer System, Biorad) με φίλτρα μήκους κύματος διέγερσης 350 nm και μήκους κύματος εκπομπής 440 nm.

3.2.21 Χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης (Confocal Laser Scanning Microscope-CLSM)

Ο φθορισμός της πρωτεΐνης GFP στα διαγονιδιακά έντομα που φέρουν το γονίδιο GFP υπό τον έλεγχο ενός υποκινητή που φέρει είτε ένα λειτουργικό στοιχείο αντιοξειδωτικής απόκρισης (ARE), είτε ένα μεταλλαγμένο ARE ή 4 συνθετικά ARE καταγράφηκε μετά από τη παρατήρηση αναισθητοποιημένων εντόμων με συνεστιακό μικροσκόπιο [Digital EclipseC1 (Nikon, Melville, NY) Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)].

3.2.22 Αναστολή της πρωτεασωμικής ενεργότητας κατά τη γαμετογένεση ή κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της αναστολής του πρωτεασώματος κατά τη διάρκεια της γαμετογένεσης, νεαρά έντομα καλλιεργούνται για 2 μέρες παρουσία του αναστολέα του πρωτεασώματος PS-341 (5-20 µM). Στη συνέχεια, τα έντομα μεταφέρονται για 1 ημέρα σε τρυβλία Petri που περιέχουν 1,5 % άγαρ και τον αναστολέα PS-341 (5-20 µM) σε χυμό από βύσσινο. Πραγματοποιείται συλλογή των αποτεθημένων εμβρύων (60 ανά πείραμα) και μεταφορά τους σε σωλήνες καλλιέργειας χωρίς την παρουσία του πρωτεασωμικού αναστολέα. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται έλεγχος της μακροβιότητας των εντόμων που εκκολάφθηκαν και καλλιεργούνται με κανονική τροφή.

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της αναστολής του πρωτεασώματος κατά τη διάρκεια των αναπτυξιακών σταδίων του εντόμου (από την απόθεση του εμβρύου μέχρι και πριν την εκκόλαψη του ενήλικου εντόμου) νεαρά θηλυκά έντομα τοποθετούνται για 1 ημέρα σε τρυβλία Petri που περιέχουν 1,5 % άγαρ σε χυμό από βύσσινο. Τα γονιμοποιημένα ωοθυλάκια (80 ανά πείραμα) τοποθετούνται στη συνέχεια σε τροφή παρουσία του αναστολέα του πρωτεασώματος PS-341 (0,5-20 µM) προκειμένου οι λάρβες να εκτεθούν στον αναστολέα. Τα ενήλικα έντομα που εκκολάπτονται (μόνο στην τροφή με συγκέντρωση του αναστολέα 0,5 µM - βλέπε Αποτελέσματα) συλλέγονται και πραγματοποιείται έλεγχος της μακροβιότητας τους μετά από καλλιέργεια σε κανονική τροφή.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

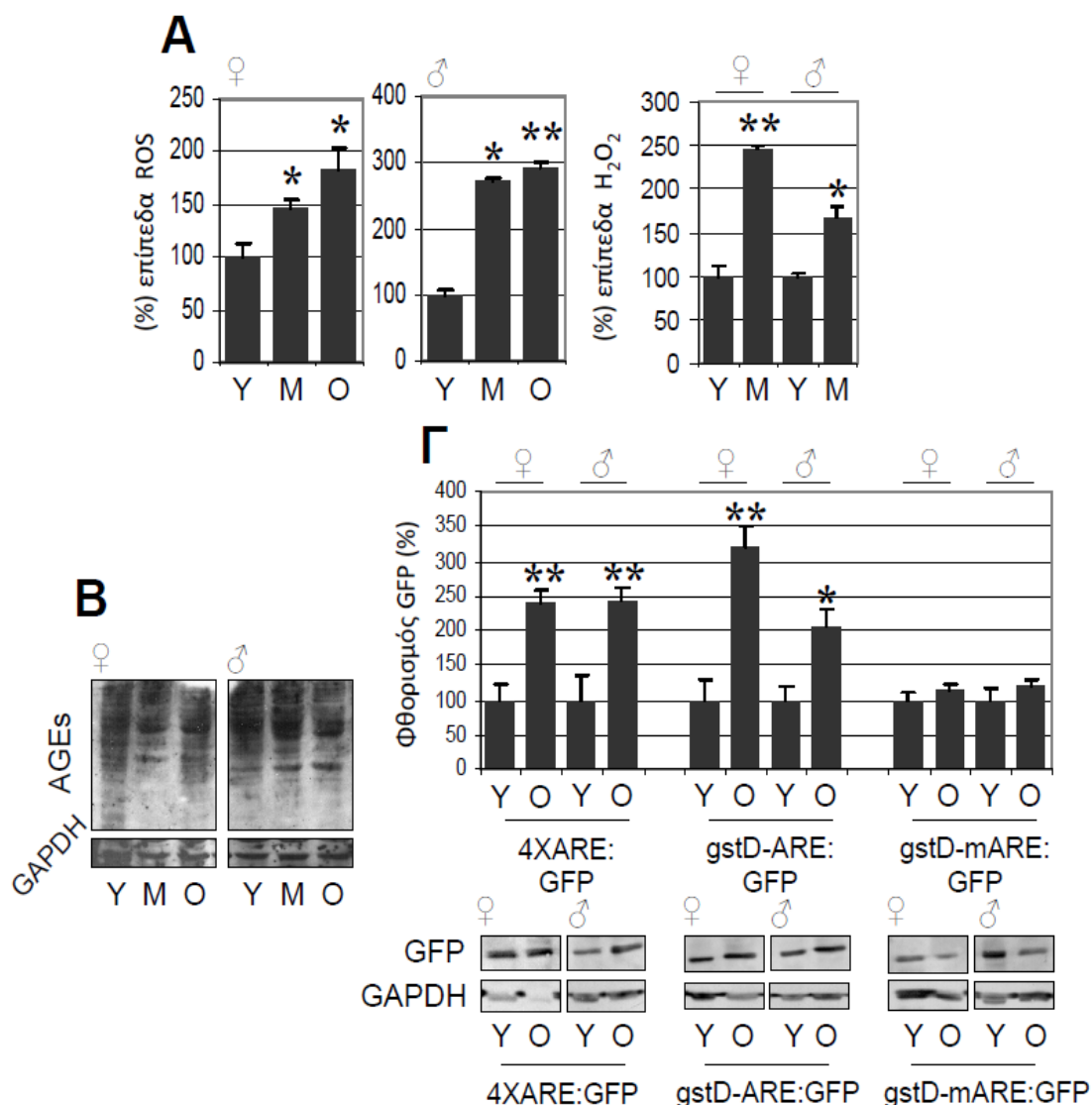
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Η γήρανση στους σωματικούς ιστούς στη *Drosophila* χαρακτηρίζεται από αύξηση του οξειδωτικού στρες και συσσώρευση των AGEs παρά την ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής απόκρισης

Προκειμένου να μελετηθούν οι αλλαγές στην πρωτεόσταση κατά τη γήρανση στη *Drosophila*, αρχικά καθορίστηκαν οι τρεις ηλικιακές ομάδες [νεαρά (Y), μέσης ηλικίας (M) και γηρασμένα έντομα (O)] μελέτης. Επίσης, καθώς παρατηρήθηκε ότι ο ιστός της κοιλιάς του εντόμου (που περιείχε και το αναπαραγωγικό σύστημα) εμφάνιζε ένα διαφορετικό τρόπο ρύθμισης της έκφρασης του πρωτεασώματος, καθώς και ότι δεν συσσωρεύει οξειδωμένες πρωτεΐνες κατά τη γήρανση (τόσο στα αρσενικά όσο και θηλυκά άτομα), οι μελέτες μας στους σωματικούς ιστούς πραγματοποιήθηκαν μετά από αφαίρεση του αναπαραγωγικού συστήματος (ωοθήκες και σπερματοθήκες). Τα πειράματά μας έδειξαν ότι οι γηρασμένοι σωματικοί ιστοί της *Drosophila* χαρακτηρίζονται από μια φυλο-εξαρτώμενη αύξηση του οξειδωτικού στρες, και ειδικότερα των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS), καθώς και των επιπέδων του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) (Εικ. 4.1Α).

Επίσης, παρατηρήθηκε αύξηση των πρωτεϊνών που έχουν τροποποιηθεί με AGEs (κυρίως στα θηλυκά έντομα) (Εικ. 4.1Β). Στη συνέχεια, προκειμένου να διερευνηθεί η ηλικιο-εξαρτώμενη λειτουργικότητα των μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν την αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου, χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά έντομα που φέρουν το γονίδιο GFP υπό τον έλεγχο ενός υποκινητή που φέρει λειτουργικό στοιχείο αντιοξειδωτικής απόκρισης (antioxidant response element; ARE) ή ένα μεταλλαγμένο ARE ή τέσσερα συνθετικά AREs (Sykiotis και Bohmann, 2008; Chatterjee και Bohmann, 2012).

Οι μελέτες μας έδειξαν ότι τα νεαρά διαγονιδιακά έντομα εμφάνισαν ήπια επαγωγή της αντιοξειδωτικής απόκρισης (έκφραση GFP), γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη ενός σχετικά ήπιου ενδογενούς στρες στον οργανισμό. Αντίθετα, στους γηρασμένους σωματικούς ιστούς παρατηρήθηκε σημαντικά εντονότερη ενεργοποίηση του γονιδίου GFP, γεγονός που δεικνύει αυξημένη επαγωγή της αντιοξειδωτικής απόκρισης. Τα ευρήματα αυτά συνάδουν με την αύξηση του οξειδωτικού στρες κατά τη γήρανση το οποίο ενεργοποιεί συγκεκριμένες αποκρίσεις αντιοξειδωτικής δράσης καθώς και ενεργοποίηση των AREs (Εικ. 4.1Γ).



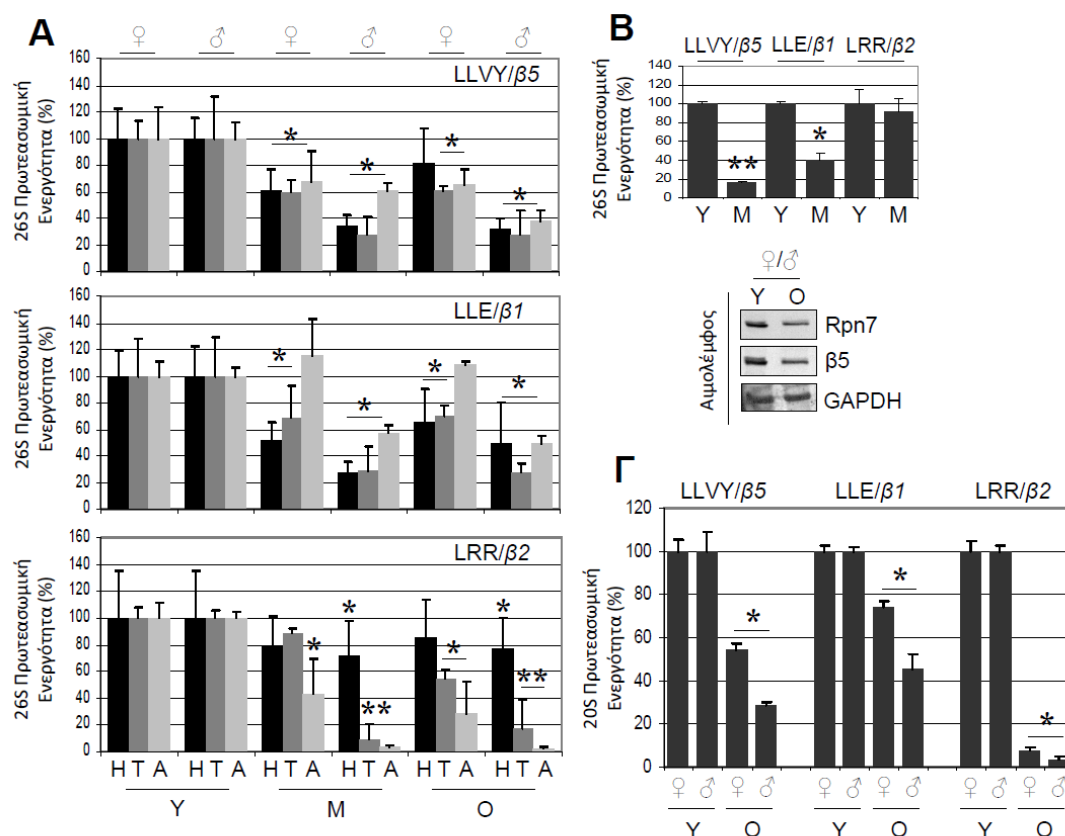
Εικόνα 4.1 Η γήρανση στους σωματικούς ιστούς στη *Drosophila* χαρακτηρίζεται από αύξηση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS), αύξηση των επιπέδων του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂), καθώς και από ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής απόκρισης του κυττάρου. (A) Σχετικά επίπεδα των ROS (%) (αριστερό διάγραμμα), του H₂O₂ (%) (δεξιό διάγραμμα) και (B) των ενδογενών τροποποιημένων πρωτεϊνών από AGEs στους σωματικούς ιστούς από νεαρά (Y), μέσης ηλικίας (M) και γηρασμένα (O) θηλυκά και αρσενικά έντομα. (Γ) Επίπεδα φθορισμού της πρωτεΐνης GFP (%) (πάνω διάγραμμα) και αντιπροσωπευτικό ανοσοστέμνωμα έναντι της πρωτεΐνης GFP (κάτω εικόνα) κατά τη γήρανση σε θηλυκά και αρσενικά διαγονιδιακά στελέχη: *gstD-ARE:GFP* (*gstD-ARE:GFP/II*), *4XARE:GFP* (*4XARE:GFP-16(R7)/II*) και *gstD-mARE:GFP* (*gstD-mARE:GFP/III*) (βλέπε Εικ. 3.2). Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για το ισοφορτώμα των δειγμάτων. Στα διαγράμματα η τυπική απόκλιση αφορά $\pm$ SD*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

4.2 Η ενζυμική ενεργότητα και έκφραση του πρωτεασώματος μειώνεται στους σωματικούς ιστούς κατά τη γήρανση

Έχοντας δείξει σε προηγούμενες μας μελέτες τη σταδιακή μείωση της πρωτεϊνικής έκφρασης των κύριων πρωτεασωματικών υπομονάδων, καθώς και της πρωτεασωματικής ενζυμικής ενεργότητας κατά την *in vivo* γήρανση στους σωματικούς ιστούς των εντόμων

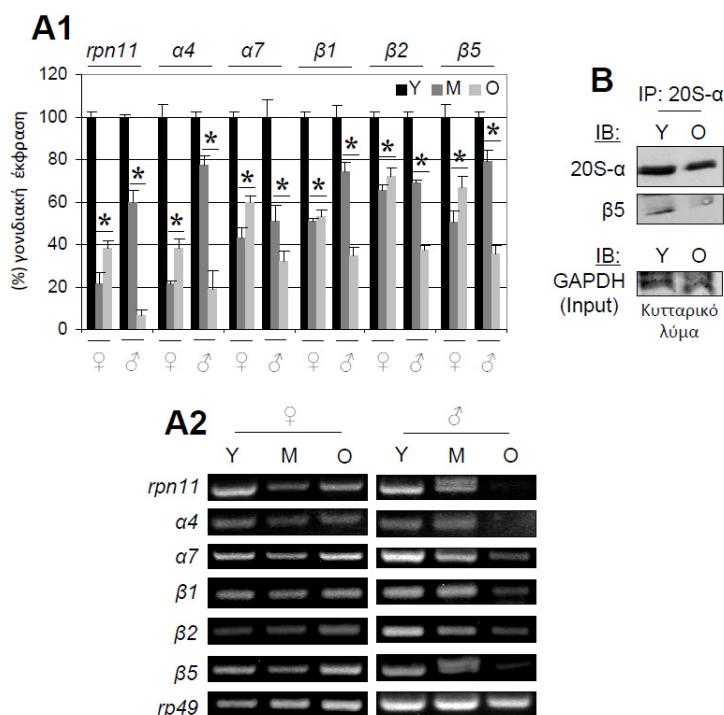
(Τσακίρη, 2010)• στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή μελετήθηκε συστηματικά η λειτουργικότητα του πρωτεασώματος κατά τη *in vivo* γήρανση.

Τα πειράματα μας έδειξαν ότι η 26S πρωτεασωμική ενεργότητα μειώνεται κατά το γήρας στους ιστούς από απομονωμένα κεφάλια, θώρακες ή κοιλίες (Εικ. 4.2Α) τόσο στα θηλυκά όσο και στα αρσενικά έντομα [με εντονότερη μείωση στα αρσενικά άτομα (Εικ. 4.2Α)], καθώς επίσης και στην αιμολέμφο (Εικ. 4.2Β). Παρόμοιο πρότυπο μειορύθμισης κατά τη γήρανση εμφάνισε και η πρωτεϊνική έκφραση των πρωτεασωμικών υπομονάδων στην αιμολέμφο (Εικ. 4.2Β). Ακόμη, μετά από ανάλυση της 20S πρωτεασωμικής ενεργότητας σε νεαρούς και γηρασμένους σωματικούς ιστούς από θηλυκά και αρσενικά έντομα διαπιστώθηκε μείωση της 20S πρωτεασωμικής ενεργότητας στους γηρασμένους σωματικούς ιστούς. Σημειώνουμε ότι εντονότερη μείωση εμφανίστηκε και, όσον αφορά στις μετρήσεις αυτές, στα αρσενικά έντομα (Εικ. 4.2Γ).



Εικόνα 4.2. Η γήρανση στους σωματικούς ιστούς, καθώς και στην αιμολέμφο των εντόμων, συνοδεύεται από μείωση τόσο της 26S όσο και της 20S πρωτεασωμικής ενεργότητας. (Α) Σχετική (%) 26S πρωτεασωμική ενεργότητα σε ιστούς από κεφάλι (H), θώρακα (T) και κοιλιά (A) σε νεαρά (Y), μέσης ηλικίας (M) και γηρασμένα (O) θηλυκά και αρσενικά έντομα. (Β) Σχετική (%) 26S πρωτεασωμική ενεργότητα (πάνω διάγραμμα) και αντιπροσωπευτικό ανοσοστύπωμα έναντι των Rpn7 και β5 πρωτεασωμικών υπομονάδων (κάτω εικόνα) στην αιμολέμφο (μικτός πληθυσμός θηλυκών και αρσενικών εντόμων) νεαρών (Y) και γηρασμένων (O) εντόμων. (Γ) Σχετική (%) 20S πρωτεασωμική ενεργότητα σε σωματικούς ιστούς νεαρών (Y) και γηρασμένων (O) θηλυκών και αρσενικών εντόμων. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για το ισοφορτώμα των δειγμάτων. Στα διαγράμματα η τυπική απόκλιση αφορά $\pm$ SD *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Σε συμφωνία με τα παραπάνω, βρέθηκε ότι η έκφραση των κύριων πρωτεασωματικών γονιδίων μειώνεται κατά τη γήρανση στους σωματικούς ιστούς του εντόμου (Εικ. 4.3Α). Επιπλέον, με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης διαπιστώθηκε ότι οι γηρασμένοι σωματικοί ιστοί διαθέτουν λιγότερα αυτοσυγκροτημένα 20S πρωτεασώματα σε σύγκριση με τους νεαρούς σωματικούς ιστούς του εντόμου (Εικ. 4.3Β).

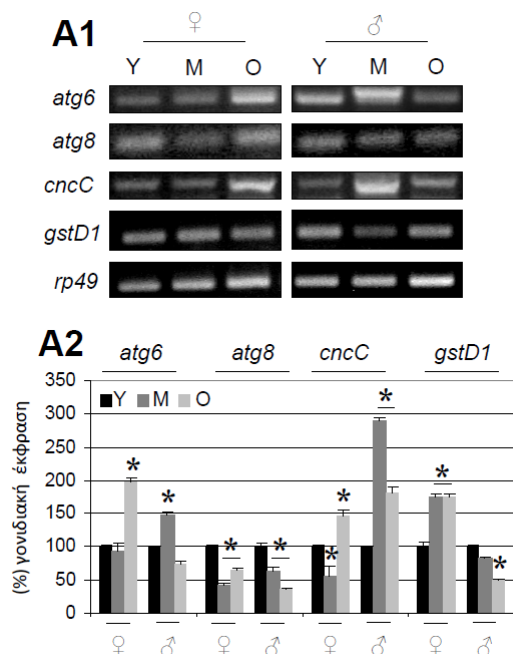


Εικόνα 4.3. Η γήρανση στους σωματικούς ιστούς στη *Drosophila* χαρακτηρίζεται από μειωμένη γονιδιακή έκφραση των κύριων πρωτεασωματικών υπομονάδων, καθώς και από μειωμένα επίπεδα αυτοσυγκροτημένων πρωτεασωμάτων. (Α) Σχετική ποσοτικοποίηση (%) (A1) και αντιπροσωπευτικό πηκτώμα αγαρόζης (A2) της γονιδιακής έκφρασης των πρωτεασωματικών γονιδίων *rpn11*, $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\beta 1$, $\beta 2$ και $\beta 5$ κατά τη γήρανση στους σωματικούς ιστούς. (Β) Ανοσοκατακρήμνιση (IP) του 20S πρωτεασώματος με αντίσωμα έναντι των α υπομονάδων (20S- α) και ανοσοεντόπιση (WB) με αντίσωμα έναντι της $\beta 5$ υπομονάδας (που υποδηλώνει την ύπαρξη αυτοσυγκροτημένου πρωτεασώματος) σε κυτταρικό λύμα σωματικών ιστών από νεαρά (Y) και γηρασμένα έντομα (O). Το γονίδιο *rp49* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς και η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για το ισοφορτώμα των δειγμάτων. Στα διαγράμματα η τυπική απόκλιση αφορά $\pm$ SD, οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τις διαφορές από τα δείγματα μάρτυρες (νεαρά έντομα) όπου *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Η μειορρύθμιση της έκφρασης των πρωτεασωματικών γονιδίων κατά τη γήρανση δεν φαίνεται να αντιπροσωπεύει ένα γενικευμένο φαινόμενο των γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της πρωτεόστασης, καθώς παρατηρήθηκαν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης κατά το γήρας όσον αφορά στα αυτοφαγικά γονίδια *atg6* και *atg8*, στο γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα *cap'n'collar isoform C*, [CncC, το ομόλογο του Nrf2 στη *Drosophila* (Sykietis

και Bohmann, 2008)] καθώς και όσον αφορά στο γονίδιο *gstD1* που σχετίζεται με την κυτταρική αντιοξειδωτική απόκριση (Εικ. 4.4).

Έτσι, η μείωση της έκφρασης των πρωτεασωμικών γονιδίων κατά τη γήρανση φαίνεται να είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της δυσλειτουργίας του λειτουργικού δικτύου σηματοδότησης που ελέγχει την πρωτεόσταση.

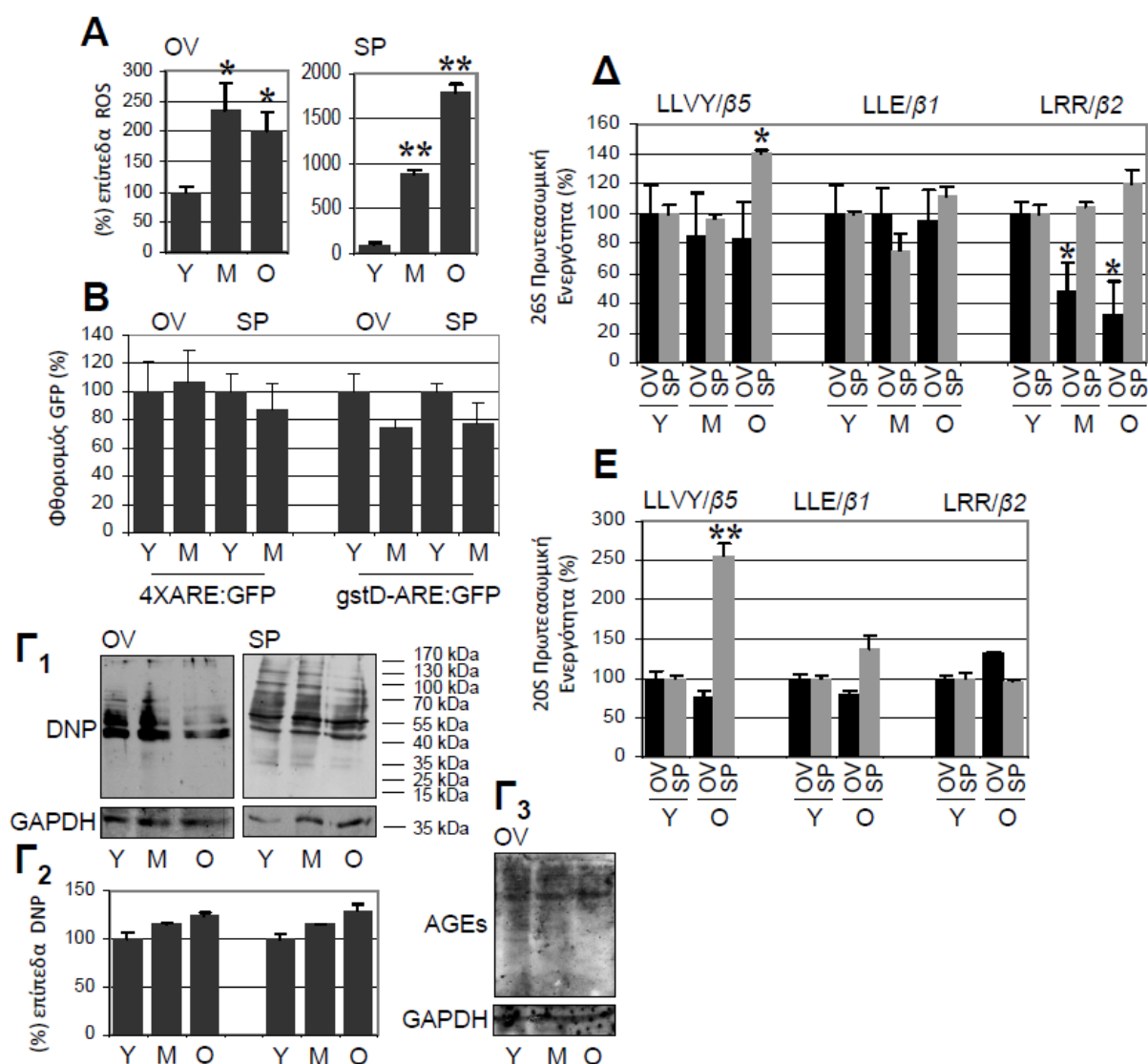


Εικόνα 4.4 Έκφραση των γονιδίων *atg6*, *atg8*, *cncC* και *gstD1* στους σωματικούς ιστούς της *Drosophila* κατά τη γήρανση. (A) Αντιπροσωπευτικό πήκτωμα αгарόζης (A1) και σχετική ποσοτικοποίηση (%) (A2) της γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων *atg6*, *atg8*, *cncC* και *gstD1* στους σωματικούς ιστούς από νεαρά (Y), μέσης ηλικίας (M) και γηρασμένα (O) θηλυκά και αρσενικά έντομα. Το γονίδιο *rp49* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των δειγμάτων προς τα νεαρά έντομα. Στα διαγράμματα η τυπική απόκλιση αφορά $\pm$ SD, οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τις διαφορές από τα δείγματα μάρτυρες (νεαρά έντομα) όπου *, $P < 0.05$.

4.3 Οι γονάδες (ωοθήκες και σπερματοθήκες) των γηρασμένων εντόμων διατηρούν σημαντικά επίπεδα έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων, καθώς και υψηλά επίπεδα ενζυμικής ενεργότητας του πρωτεασώματος

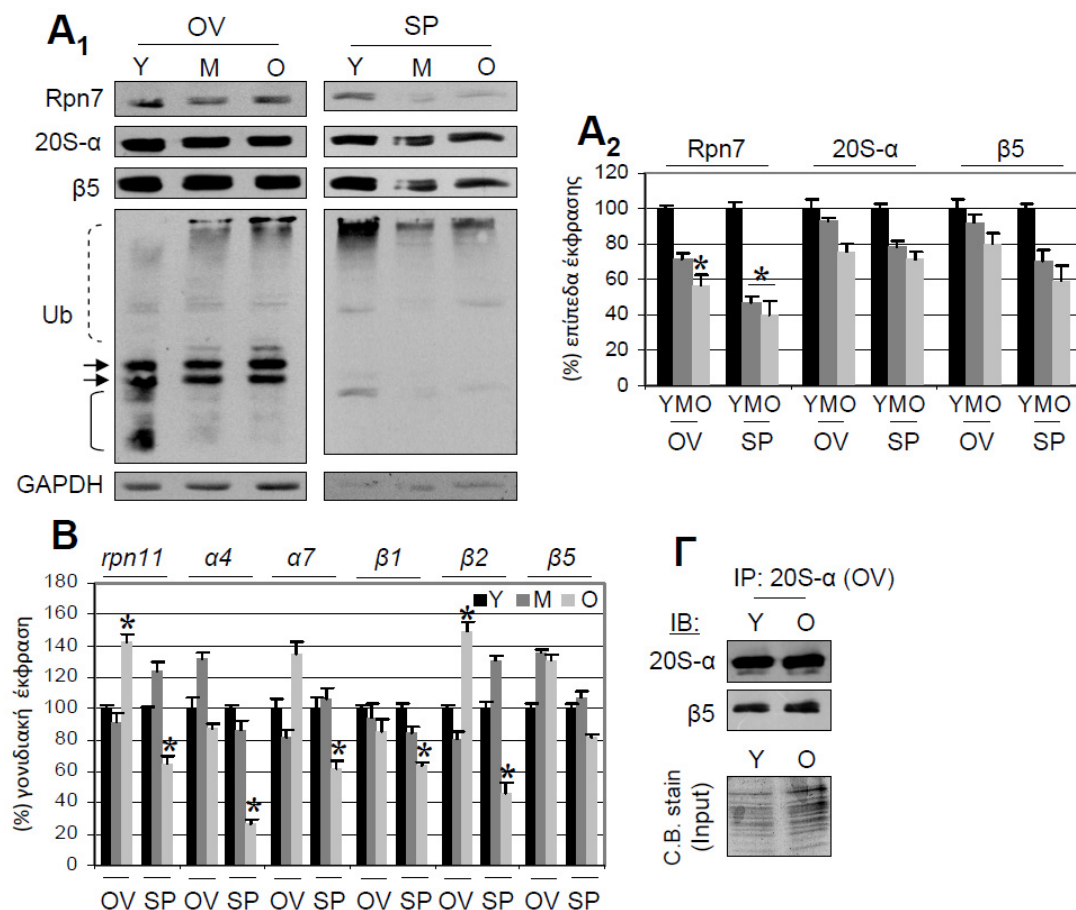
Προηγούμενες μελέτες μας είχαν δείξει ότι απομονωμένες κοιλίες των θηλυκών εντόμων (που περιείχαν τις ωοθήκες) εμφάνιζαν διαφορετικό τρόπο ρύθμισης της έκφρασης του πρωτεασώματος σε σχέση με άλλους ιστούς (π.χ. ιστοί από το κεφάλι), καθώς και ότι δεν εμφάνιζαν ηλικιο-εξαρτώμενη αύξηση οξειδωμένων πρωτεϊνών (Τσακίρη, 2010). Έτσι, μελετήθηκαν οι μεταβολές του πρωτεώματος, καθώς και του συστήματος διατήρησης της πρωτεόστασης σε απομονωμένες γονάδες (ωοθήκες και σπερματοθήκες) του εντόμου.

Ειδικότερα, απομονώθηκαν ωοθήκες και σπερματοθήκες, από νεαρά, μέσης ηλικίας και γηρασμένα θηλυκά και αρσενικά έντομα, προκειμένου να μελετηθεί η λειτουργικότητα του πρωτεώματος και η ρύθμιση του πρωτεασώματος κατά την *in vivo* γήρανση.



Εικόνα 4.5. Οι γονάδες από τα γηρασμένα έντομα διατηρούν χαμηλά επίπεδα τροποποιημένων πρωτεϊνών (είτε καρβονυλιωμένες είτε τροποποιημένες AGEs), καθώς και σταθερά επίπεδα 26S και 20S πρωτεασωμικής ενεργότητας. (A) Σχετικά επίπεδα ROS (%) στις ωοθήκες (OV) και σπερματοθήκες (SP) από έντομα νεαρής (Y), μέσης ηλικίας (M) καθώς και από γηρασμένα έντομα (O). (B) Σχετικός φθορισμός της πρωτεΐνης GFP, που υποδηλώνει της ενεργοποίηση των ARES, σε θηλυκά και αρσενικά διαγονιδιακά έντομα (4XARE:GFP και *gstD*-ARE:GFP) κατά τη γήρανση. (Γ) Αντιπροσωπευτικό ανοσοσύτρωμα (Γ1) και ποσοτικοποίηση των οξειδωμένων πρωτεϊνών (Γ2), καθώς και ανοσοσύτρωμα των πρωτεϊνών που έχουν τροποποιηθεί με AGEs (Γ3) στις γονάδες θηλυκών και αρσενικών εντόμων κατά τη γήρανση. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για το ισοφόρτωμα των δειγμάτων. (Δ, Ε) Σχετική (%) 26S (Δ) και 20S (Ε) πρωτεασωμική ενεργότητα στις ωοθήκες και σπερματοθήκες κατά τη γήρανση. Τυπική απόκλιση $\pm$ SD *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

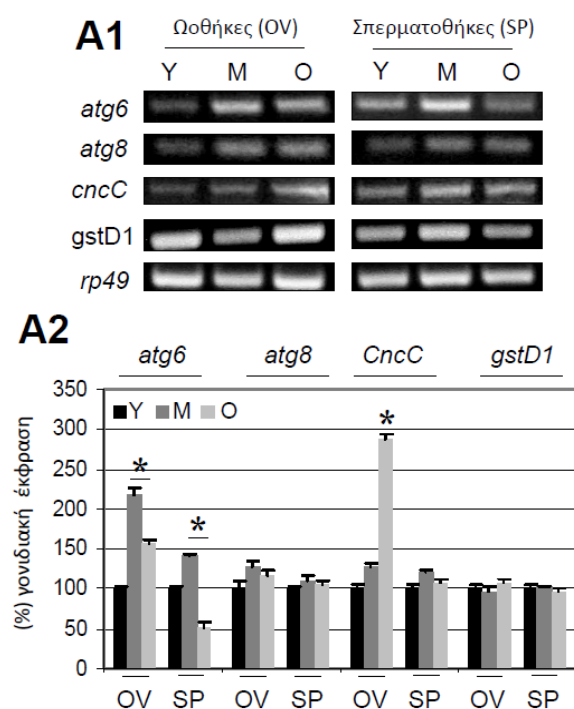
Παρά τα υψηλότερα επίπεδα οξειδωτικού στρες (ROS) στις γονάδες των γηρασμένων εντόμων (Εικ. 4.5A) και την απουσία ενεργοποίησης της αντιοξειδωτικής απόκρισης μέσω AREs (καθώς δεν παρατηρήθηκε αυξημένη παραγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης GFP στα διαγονιδιακά έντομα) (Εικ. 4.5B), δεν βρέθηκε συσσώρευση των οξειδωμένων πρωτεϊνών στις γονάδες γηρασμένων ατόμων (Εικ. 4.5Γ1-2). Επίσης, δεν παρατηρήθηκε συσσώρευση των πρωτεϊνών που έχουν τροποποιηθεί με AGEs (Εικ. 4.5Γ3).



Εικόνα 4.6. Οι γονάδες από γηρασμένα έντομα διατηρούν σχετικά σταθερά τα επίπεδα έκφρασης του πρωτεασώματος. (A) Αντιπροσωπευτικό ανοσοστύπωμα (A₁) και ποσοτικοποίηση (%) του ανοσοστυπώματος (A₂) έναντι των πρωτεϊνών Rpn7, 20S-α, β5 και της ουβικιτίνης σε δείγματα από ωθήκες και σπερματοθήκες νεαρών (Y), μέσης ηλικίας (M) και γηρασμένων εντόμων. Η διακεκομμένη γραμμή (A₁, στο ανοσοστύπωμα της ουβικιτίνης) υποδηλώνει πολυπεπτίδια με αυξημένη ουβικιτινίωση κατά τη γήρανση, τα βελη επισημαίνουν πολυπεπτίδια που φαίνεται να μην αλλάζει το πρότυπο ουβικιτινίωσης τους ενώ η συνεχής γραμμή δείχνει πολυπεπτίδια με μειωμένη ουβικιτινίωση κατά τη γήρανση. (B) Σχετική ποσοτικοποίηση (%) της έκφρασης των γονιδίων *rpn11*, *α4*, *α7*, *β1*, *β2* και *β5* στις γονάδες κατά τη γήρανση. (Γ) Ανοσοκατακρήμνιση (IP) του 20S πρωτεασώματος με αντίσωμα έναντι των α υπομονάδων (20S-α) και ανοσοεντόπιση (WB) με αντίσωμα έναντι της β5 υπομονάδας (που υποδηλώνει την ύπαρξη αυτοσυγκροτημένου πρωτεασώματος) σε κυτταρικό λύμα από ωθήκες νεαρών και γηρασμένων εντόμων. Η χρωστική coomassie blue (C.B.) δεικνύει το ισοφόρτωμα των δειγμάτων. Το γονίδιο *rp49* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς και η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για το ισοφόρτωμα των δειγμάτων. Τυπική απόκλιση $\pm$ SD, οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τις διαφορές από τα δείγματα μάρτυρες (γονάδες) νεαρών ατόμων όπου *, P<0.05; **, P<0.01.

Ακόμη, βρέθηκε ότι στις γονάδες γηρασμένων εντόμων δεν παρατηρείται σημαντική μείωση της ενζυμικής ενεργότητας του 26S και 20S πρωτεασώματος (με εξαίρεση την ενεργότητα θρυψίνης στον ωοθηκικό ιστό) (Εικ. 4.5Δ, 4.5Ε). Είναι ενδιαφέρον ότι, σε ορισμένες περιπτώσεις, οι πρωτεασωμικές ενζυμικές ενεργότητες βρέθηκαν να είναι αυξημένες στις γονάδες που απομονώθηκαν από γηρασμένα άτομα (Εικ. 4.5Δ, 4.5Ε).

Περαιτέρω αναλύσεις επιβεβαίωσαν αυτά τα ευρήματα, καθώς παρατηρήθηκε ότι οι γονάδες διατηρούν σχετικά σταθερά επίπεδα πρωτεϊνικής (Εικ. 4.6Α) και γονιδιακής (Εικ. 4.6Β) έκφρασης του πρωτεασώματος, καθώς και αυτοσυγκροτημένων πρωτεασωμάτων (Εικ. 4.6Γ) κατά τη γήρανση. Παρατηρήθηκε επίσης μείωση στην έκφραση πρωτεΐνης για την ρυθμιστική υπομονάδα Rpn7 του 19S πρωτεασώματος τόσο στις ωοθήκες όσο και στις σπερματοθήκες (Εικ. 4.6Α), η οποία ωστόσο ήταν σημαντικά μικρότερη σε σύγκριση με τη μείωση της έκφρασης που είχε βρεθεί στους σωματικούς ιστούς (Τσακίρη 2010).



Εικόνα 4.7 Έκφραση των γονιδίων *atg6*, *atg8*, *cncC* και *gstD1* στις γονάδες της *Drosophila* κατά τη γήρανση. Α) Αντιπροσωπευτικό πηκτωμα αгарόξης (A1) και σχετική ποσοτικοποίηση (%) (A2) της γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων *atg6*, *atg8*, *cncC* και *gstD1* στις ωοθήκες και σπερματοθήκες από νεαρά (Y), μέσης ηλικίας (M) και γηρασμένα (O) θηλυκά και αρσενικά έντομα. Το γονίδιο *rp49* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για τη κανονικοποίηση των δειγμάτων προς τις νεαρές γονάδες. Τυπική απόκλιση $\pm$ SD, *, $P < 0.05$.

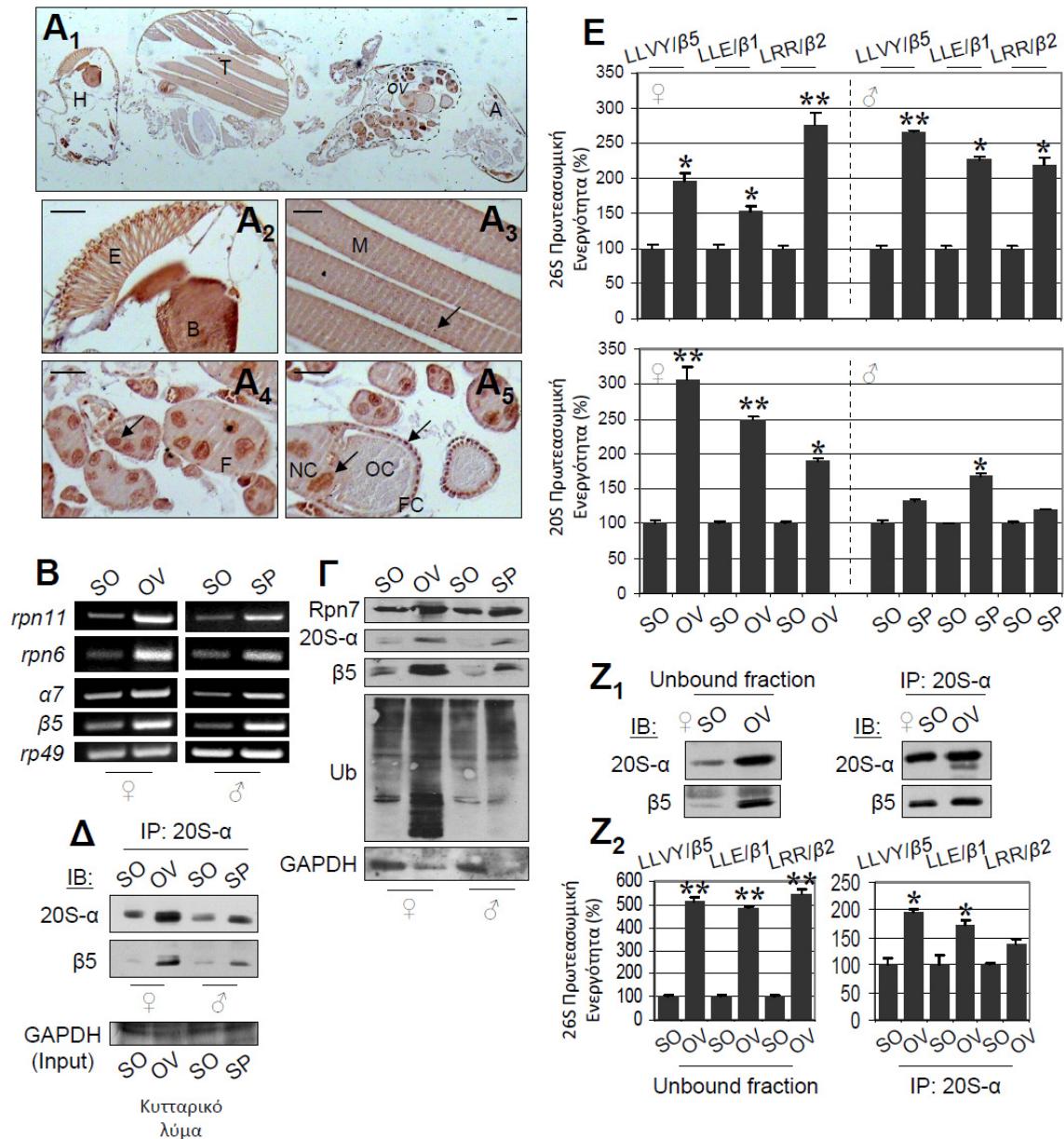
Η σταθερότητα των λειτουργικών δικτύων διατήρησης της πρωτεόστασης στις γονάδες των γηρασμένων εντόμων ήταν επίσης εμφανής από το γεγονός ότι (με εξαίρεση την έκφραση του γονιδίου *atg6* που βρέθηκε μειωμένη στις γηρασμένες σπερματοθήκες) η έκφραση των γονιδίων *atg6*, *atg8*, *cncC* και *gstD1* βρέθηκε να είναι σταθερή ή ακόμη και

αυξημένη (π.χ. γονίδια *atg6* και *cncC* στα θηλυκά έντομα) στις γονάδες των γηρασμένων ατόμων (Εικ. 4.7). Ως περαιτέρω απόδειξη της ύπαρξης ενός πιο ενεργού πρωτεασώματος στις γονάδες είναι το γεγονός ότι αν και το πρότυπο των ουβικιτινιωμένων πρωτεϊνών φάνηκε να αλλάζει στο ωοθηκικό ιστό, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσσώρευση των ουβικιτινιωμένων πρωτεϊνών κατά τη γήρανση (Εικ. 4.6Α). Συμπερασματικά, οι γονάδες των γηρασμένων ατόμων διατηρούν λειτουργικά πρωτεασώματα κατά τη γήρανση.

4.4 Οι γονάδες των νεαρών εντόμων διαθέτουν πιο άφθονα και πιο ενεργά πρωτεασώματα σε σύγκριση με τους σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων

Καθώς τα προηγούμενα ευρήματα έδειξαν ότι οι γονάδες διαθέτουν ένα πιο ανθεκτικό πρωτεάσωμα κατά τη γήρανση, στη συνέχεια μελετήθηκε συγκριτικά η ρύθμιση του πρωτεασώματος στις γονάδες και στους σωματικούς ιστούς νεαρών θηλυκών και αρσενικών εντόμων. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας σε τομές από ολόκληρα θηλυκά έντομα. Χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα έναντι των α υπομονάδων του πρωτεασώματος παρατηρήθηκε τόσο κυτταροπλασματική όσο και πυρηνική εντόπιση των α υπομονάδων σε όλους τους ιστούς του εντόμου (Εικ. 4.8Α1). Η εντονότερη χρώση εντοπίστηκε στο νευρικό ιστό στο κεφάλι του εντόμου, στο μυϊκό ιστό του θώρακα καθώς και στον ωοθηκικό ιστό (Εικ. 4.8Α2-5). Ειδικότερα, στον ωοθηκικό ιστό, θετική χρώση εντοπίστηκε σε όλα τα στάδια της ωογένεσης και σε όλους τους κυτταρικούς τύπους (ωοκύτταρο, τροφοκύτταρα και θυλακοκύτταρα) (Εικ. 4.8Α4-5). Περαιτέρω συγκριτικές αναλύσεις της έκφρασης του πρωτεασώματος, της αυτοσυγκρότησης του• καθώς και της ενεργότητας των τριών πρωτεασωμικών ενζυματικών ενεργοτήτων στους σωματικούς ιστούς και στις γονάδες νεαρών θηλυκών και αρσενικών εντόμων έδειξαν υψηλότερα επίπεδα γονιδιακής (Εικ. 4.8Β) και πρωτεϊνικής (Εικ. 4.8Γ) έκφρασης των κύριων υπομονάδων τόσο του 19S όσο και του 20S πρωτεασώματος στις γονάδες των εντόμων, σε σύγκριση με τους σωματικούς ιστούς. Παρατηρήθηκαν επίσης αυξημένα επίπεδα ουβικιτινιωμένων πρωτεϊνών στις γονάδες σε σύγκριση με το σώμα (Εικ. 4.8Γ). Το εύρημα αυτό πιθανότατα σχετίζεται με το γεγονός ότι οι γονάδες αποτελούνται κυρίως από μιτωτικά κύτταρα και επομένως οι πρωτεΐνες μικρού χρόνου ζωής (π.χ. κυκλίνες) αναμένεται να εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα σε σύγκριση με τα μετα-μιτωτικά κύτταρα του σωματικού ιστού.

Επιπλέον, οι ωοθήκες και οι σπερματοθήκες εμφάνισαν (σε σύγκριση με τους σωματικούς ιστούς) αυξημένα επίπεδα αυτοσυγκροτημένων πρωτεασωμάτων (Εικ. 4.8Δ) και αυξημένα επίπεδα ενζυμικής ενεργότητας τόσο του 26S όσο και του 20S πρωτεασώματος (Εικ. 4.8Ε)..



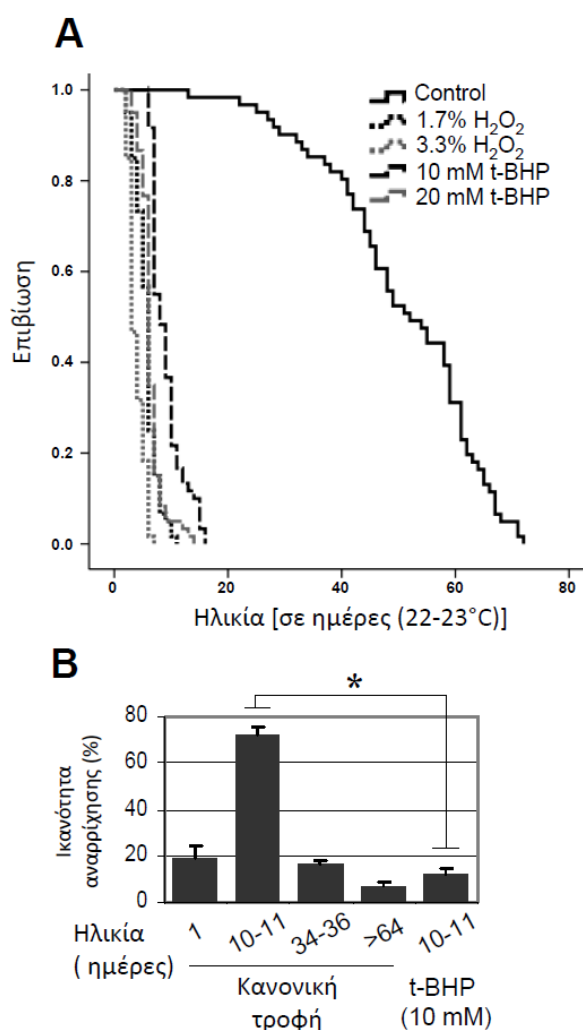
Εικόνα 4.8. Οι γονάδες των νεαρών εντόμων διαθέτουν πιο άφθονα και πιο ενεργά πρωτεασώματα σε σύγκριση με τους σωματικούς ιστούς. (Α) Αντιπροσωπευτική ανοσοϊστοχημεία από ολόκληρο θηλυκό έντομο με τη χρήση αντισώματος έναντι των α υπομονάδων του πρωτεασώματος. Θετική χρώση εντοπίζεται (Α₁) στο κεφάλι (H), στο θώρακα (T) και στη κοιλιά (A). Εντονότερη χρώση εμφανίζεται στον ωθηκικό ιστό (ον, Α₁, διακεκομμένη γραμμή), στο νευρικό ιστό του κεφαλιού [π.χ. στο ομματίδιο (E) και τα ωευρικά γάγγλια (B)] (Α₂) καθώς και στον μυϊκό ιστό (M) του θώρακα (Α₃). Στις ωθήκες (Α₄; F), η χρώση εντοπίζεται στα τροφοκύτταρα (NC), στο ωκύτταρο (OC) και στα θυλακοκύτταρα (FC) (Α₅). (Β-Γ) Συγκριτική ανάλυση της γονιδιακής (Β) και πρωτεϊνικής (Γ) έκφρασης των πρωτεασωμικών γονιδίων που αναγράφονται στην εικόνα στους σωματικούς ιστούς (SO) και στις γονάδες (OV, SP) νεαρών θηλυκών και αρσενικών εντόμων ηλικίας 10-13 ημερών. (Δ) Ανοσοκατακρήμνιση (IP) του 20S πρωτεασώματος με αντίσωμα έναντι των α υπομονάδων (20S-α) και ανοσοεντόπιση (WB) με αντίσωμα έναντι της β5 υπομονάδας (που υποδηλώνει την ύπαρξη αυτοσυγκροτημένου πρωτεασώματος) σε κυτταρικό λύμα από σωματικούς ιστούς και γονάδες νεαρών θηλυκών και αρσενικών εντόμων ηλικίας 10-13 ημερών. (Ε) Σχετική (%) 26S (πάνω διάγραμμα) και 20S (κάτω διάγραμμα) πρωτεασωμική ενεργότητα στους σωματικούς ιστούς και στις γονάδες νεαρών θηλυκών και αρσενικών

εντόμων ηλικίας 10-13 ημερών. (Z) Ανοσοκατακρήμνιση (IP) του 20S πρωτεασώματος με τη χρήση του αντισώματος έναντι των α υπομονάδων (anti-20S- α) και ανοσοστύπωμα (IB) με τη χρήση αντισωμάτων έναντι των α υπομονάδων (anti-20S- α) και της $\beta 5$ υπομονάδας. Μια ελάχιστη ποσότητα του αντισώματος anti-20S- α χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να ανοσοκατακρημνιστεί ίση ποσότητα λειτουργικών πρωτεασωμάτων από το σωματικό ιστό και τις ωοθήκες. (Z1) Αν και στο υπερκείμενο κυτταρικό λύμα του ωοθηκικού ιστού μετά την ανοσοκατακρήμνιση (unbound fraction) περιέχεται υψηλότερη ποσότητα πρωτεασωμάτων σε σύγκριση με το σώμα, στο λύμα που κατακρημνίστηκε (IP: 20S- α) εντοπίστηκε παρόμοια ποσότητα αυτοσυγκροτημένων πρωτεασωμάτων. (Z2) Σχετική (%) 26S πρωτεασωματική ενεργότητα στο πρωτεϊνικό λύμα που δεν κατακρημνίστηκε (unbound fraction) με το αντίσωμα (anti-20S- α) και στο πρωτεϊνικό λύμα που κατακρημνίστηκε με το αντίσωμα (anti-20S- α) στους σωματικούς ιστούς και τις ωοθήκες θηλυκών εντόμων. Το γονίδιο *rp49* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς και η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για το ισοφόρτωμα των δειγμάτων. Τυπική απόκλιση $\pm$ SD, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. Μπάρες στο τμήμα (A) της εικόνας, 50 μ m.

Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια να απαντηθεί το ερώτημα αν τα πρωτεασώματα των γονάδων φέρουν υψηλότερα επίπεδα ενδογενούς ενζυμικής ενεργότητας σε σύγκριση με τα πρωτεασώματα του σωματικού ιστού. Προκειμένου να απαντηθεί αυτό το ερώτημα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοκατακρήμνισης. Ειδικότερα, απομονώθηκε ίση ποσότητα λειτουργικών πρωτεασωμάτων από σωματικούς ιστούς καθώς και από ωοθήκες θηλυκών νεαρών εντόμων (μέσω ανοσοκατακρήμνισης) χρησιμοποιώντας μικρή συγκέντρωση του αντισώματος έναντι των α υπομονάδων του πρωτεασώματος. Όπως φαίνεται στην Εικ. 4.8Z, αυτή η πειραματική προσέγγιση είχε ως αποτέλεσμα την ανοσοκατακρήμνιση ίσων ποσοτήτων λειτουργικών πρωτεασωμάτων από τους σωματικούς ιστούς και τις ωοθήκες. Η ανάλυση της ενζυμικής ενεργότητας των απομονωμένων πρωτεασωμάτων έδειξε υψηλότερα επίπεδα και για τις τρεις πρωτεασωματικές ενζυμικές ενεργότητες στα ωοθηκικά πρωτεασώματα.

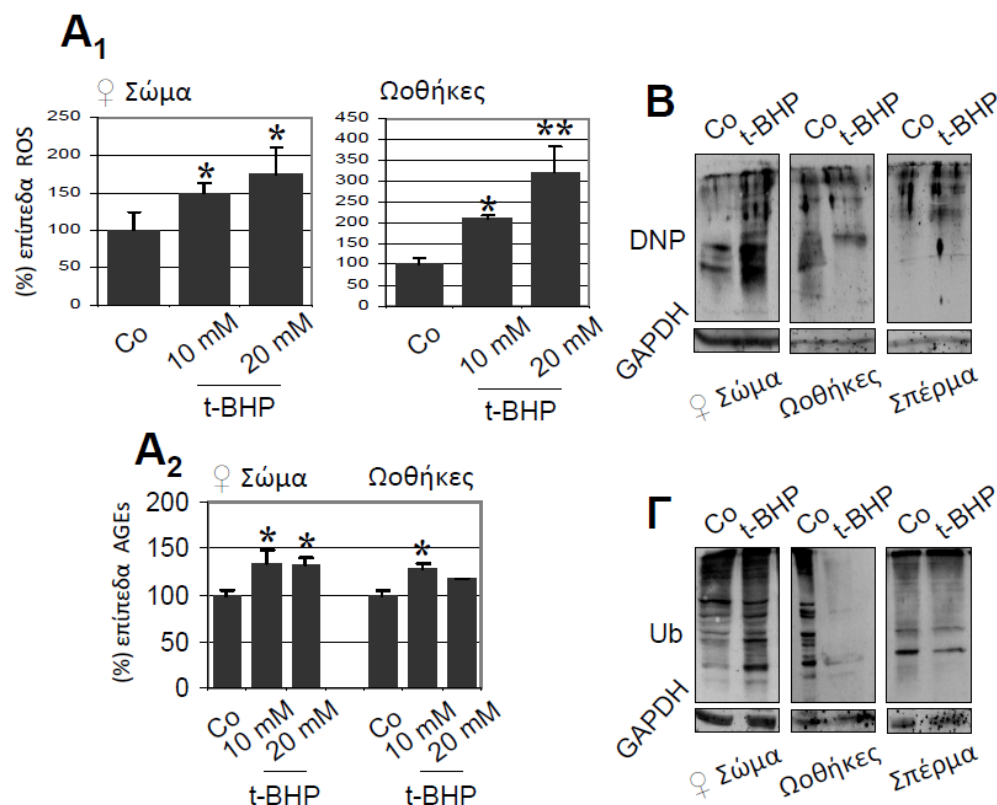
4.5 Τα πρωτεασώματα των γονάδων (ανεξαρτήτως ηλικίας) είναι πιο ανθεκτικά στο οξειδωτικό στρες-διατήρηση των μηχανισμών αντιοξειδωτικής απόκρισης ανεξαρτήτως ηλικίας στις γονάδες

Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια να απαντηθεί το ερώτημα αν οι σωματικοί ιστοί και οι γονάδες αποκρίνονται με την ίδια ένταση παρουσία εξωγενούς στρες. Προκειμένου να απαντηθεί το ερώτημα αυτό, νεαρά έντομα (10-15 ημερών) εκτέθηκαν στους οξειδωτικούς παράγοντες t-BHP και H_2O_2 . Όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες (Golden et al., 2002) και επιβεβαιώθηκε στη παρούσα μελέτη, η έκθεση των εντόμων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις των οξειδωτικών παραγόντων t-BHP ή H_2O_2 προκαλεί δοσο- εξαρτώμενη μείωση τόσο της μακροβιότητας (Εικ. 4.9A) όσο και της κινητικής ικανότητας των εντόμων (Εικ. 4.9B).



Εικόνα 4.9. Το προσδόκιμο ζωής και η κινητική ικανότητα αγρίου τύπου εντόμων μετά από έκθεση σε οξειδωτικό στρες (H₂O₂ ή t-BHP).(A) Καμπύλες μακροβιότητας εντόμων που καλλιεργήθηκαν για όλη τη διάρκεια της ζωής τους σε 1.7% H₂O₂, 3.3 % H₂O₂, 10 mM t-BHP ή 20 mM t-BHP. Παρατηρήθηκε σημαντική ($P < 0.05$) δοσο-εξαρτώμενη μείωση του προσδόκιμου ζωής: Έντομα μάρτυρες (μέση τιμή προσδόκιμου ζωής, 52 ± 3.9 days), 1.7% H₂O₂ (μέση τιμή προσδόκιμου ζωής, 6 ± 0.17 days), H₂O₂ 3.3% (μέση τιμή προσδόκιμου ζωής, 3 ± 0.24 days), t-BHP 10 mM (μέση τιμή προσδόκιμου ζωής, 8 ± 0.70 days) και t-BHP 20 mM (μέση τιμή προσδόκιμου ζωής, 6 ± 0.14 days) (B) (%) κινητική ικανότητα των εντόμων που εκτέθηκαν σε 10 mM t-BHP. Τα επίπεδα της κινητικής ικανότητας παρουσία του t-BHP εμφανίστηκαν παρόμοια με αυτά των γηρασμένων εντόμων. Τα στατιστικά δεδομένα των διαγραμμάτων μακροβιότητας αναφέρονται στον Πίνακα 1 του Παραρτήματος Ι. Τυπική απόκλιση, $\pm$ SD; *, $P < 0.05$.

Επιπλέον, η έκθεση των εντόμων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP για διάφορα χρονικά διαστήματα προκάλεσε (όπως αναμένετο) αύξηση των επιπέδων ROS και των AGEs τόσο στους σωματικούς ιστούς όσο και στις ωοθήκες των θηλυκών ατόμων (Εικ. 4.10Α). Βρέθηκε επίσης, ότι οι οξειδωμένες και ουβικιτινωμένες πρωτεΐνες συσσωρεύτηκαν στους σωματικούς ιστούς των θηλυκών ατόμων αλλά όχι στις ωοθήκες (Εικ. 4.10Β, 4.10Γ).

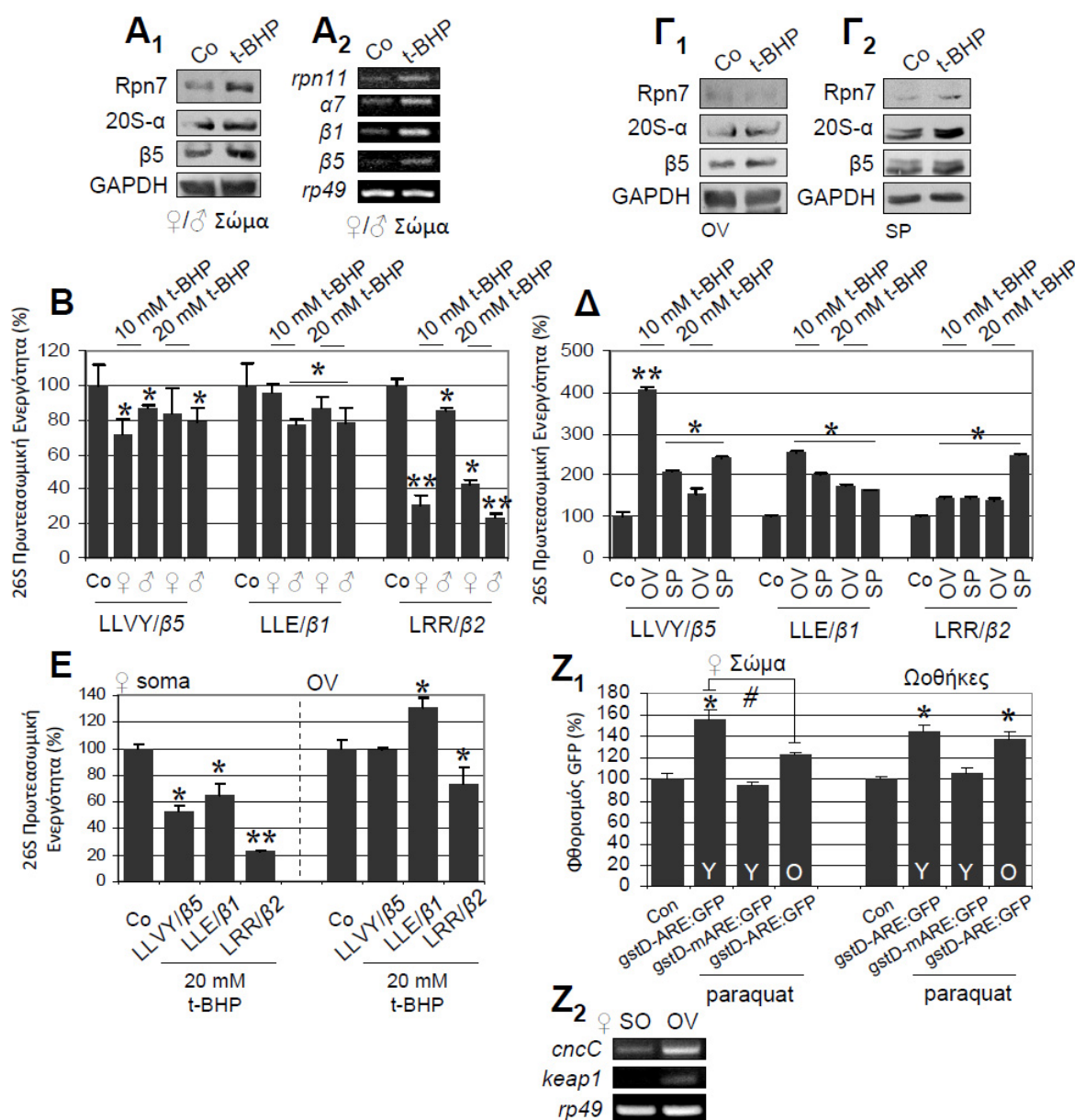


Εικόνα 4.10. Έκθεση αγρίου τύπου εντόμων στον οξειδωτικό παράγοντα t-BHP προκαλεί αύξηση του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου (ROS) και των AGEs σε όλους τους ιστούς, καθώς και σε συσσώρευση των οξειδωμένων και ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών στους σωματικούς ιστούς. (Α) Σχετικά επίπεδα (%) ROS (A₁) και AGEs (A₂) σε σωματικούς ιστούς και ωοθήκες θηλυκών εντόμων μετά από έκθεση σε 10 και 20 mM t-BHP για 8-13 και 3-4 ημέρες, αντίστοιχα. Τα ενδογενή επίπεδα ROS και AGEs των εντόμων μάρτυρες τέθηκαν ως 100%. (Β, Γ) Οξειδωμένες (Β) και ουβικιτινωμένες (Γ) πρωτεΐνες από σωματικούς ιστούς, ωοθήκες και σπερματοθήκες εντόμων που εκτέθηκαν σε 10 mM t-BHP για 8-13 ημέρες. Η πρωτεΐνη GAPDH και η ακτίνη (Actin) χρησιμοποιήθηκαν ως πρωτεΐνες αναφοράς για τη παρουσίαση του ισοφορτώματος. Co, δείγμα μάρτυρα. Τυπική απόκλιση, $\pm$ SD, *, $P < 0.05$.

Η παρατήρηση αυτή εξηγήθηκε από το εύρημα ότι, αν και η έκθεση στον οξειδωτικό παράγοντα t-BHP οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης των κύριων υπομονάδων του 19S και 20S πρωτεασώματος (Εικ 4.11Α, 4.11Γ) τόσο στους σωματικούς ιστούς όσο και στις ωοθήκες, η ενζυμική ενεργότητα του πρωτεασώματος εμφανίστηκε μειωμένη στο σώμα αλλά όχι στις γονάδες όπου αντίθετα παρατηρήθηκε αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας (Εικ. 4.11Β, 4.11Δ).

Ακόμη, οι γονάδες φάνηκε να διατηρούν την ικανότητα απόκρισης παρουσία στρες και κατά τη γήρανση, καθώς όταν εκτέθηκαν γηρασμένα έντομα στον οξειδωτικό παράγοντα t-BHP (στις ίδιες συνθήκες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για τα νεαρά έντομα) διαπιστώθηκε μείωση της πρωτεασωματικής ενεργότητας κατά περίπου 50% στους σωματικούς ιστούς των εντόμων, ενώ αντίθετα στις γονάδες των ίδιων εντόμων η ενεργότητα του πρωτεασώματος φάνηκε να μην επηρεάζεται σημαντικά (Εικ. 4.11Ε).

Προκειμένου να απαντηθεί αν αυτό το εύρημα αντανακλά στην επιτυχή ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής απόκρισης στις γονάδες, νεαρά και γηρασμένα διαγονιδιακά έντομα τα οποία φέρουν το γονίδιο GFP υπό τον έλεγχο ενός λειτουργικού (ή μη) υποκινητή για το στοιχείο αντιοξειδωτικής απόκρισης (ARE, βλέπε παραπάνω) εκτέθηκαν στον οξειδωτικό παράγοντα paraquat.



Εικόνα 4.11 Τα πρωτεασώματα των γονάδων είναι πιο ανθεκτικά παρουσία οξειδωτικού στρες (σε σύγκριση με αυτά του σωματικού ιστού) ανεξαρτήτως ηλικίας. (A) Αντιπροσωπευτικό ανοσοστύπωμα (A₁) και γονιδιακή έκφραση (A₂) των πρωτεασωμικών υπομονάδων που αναγράφονται στην εικόνα σε σωματικούς ιστούς (soma) από νεαρά έντομα [μεικτός πληθυσμός (θηλυκά και αρσενικά έντομα)] που εκτέθηκαν σε 10 mM t-BHP για 8-13 ημέρες. (B) Σχετική (%) 26S πρωτεασωμική ενεργότητα σε σωματικούς ιστούς (soma) νεαρών εντόμων που εκτέθηκαν σε 10 mM t-BHP για 8-13 ημέρες ή σε 20 mM t-BHP για 3-4 ημέρες. (Γ) Αντιπροσωπευτικό ανοστύπωμα των πρωτεασωμικών υπομονάδων που αναγράφονται στην εικόνα σε ωοθήκες (OV) (Γ₁) και σπερματοθήκες (SP) (Γ₂) από νεαρά έντομα που εκτέθηκαν σε 10 mM t-BHP για 8-13 ημέρες. (Δ) Σχετική (%) 26S

πρωτεασωμική ενεργότητα σε ωοθήκες (OV) νεαρών εντόμων που εκτέθηκαν σε 10 ή 20 mM t-BHP για 8-13 ή 3-4 ημέρες, αντίστοιχα. (E) Σχετική (%) 26S πρωτεασωμική ενεργότητα σε σωματικούς ιστούς (soma) και ωοθήκες (OV) από γηρασμένα έντομα που εκτέθηκαν σε 20 mM t-BHP για 3-4 ημέρες. (Z) Σχετικά επίπεδα (%) φθορισμού της πρωτεΐνης GFP σε σωματικούς ιστούς (soma) και ωοθήκες (ovaries) από νεαρά (Y) και γηρασμένα (O) θηλυκά διαγονιδιακά έντομα *gstD-ARE:GFP* και *gstD-mARE:GFP* που εκτέθηκαν σε 20 mM paraquat για 15 ώρες (Z1)• έκφραση των γονιδίων *cncC* και *keap1* (Z2) σε σωματικούς ιστούς (SO) και ωοθήκες (OV) από νεαρά θηλυκά φυσιολογικού τύπου έντομα ηλικίας 10-13 ημερών. Το γονίδιο *rp49* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς και η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για το ισοφόρτωμα των δειγμάτων. Co, δείγμα μάρτυρας. Τυπική απόκλιση $\pm$ SD, *, $P<0.05$; **, $P<0.01$.

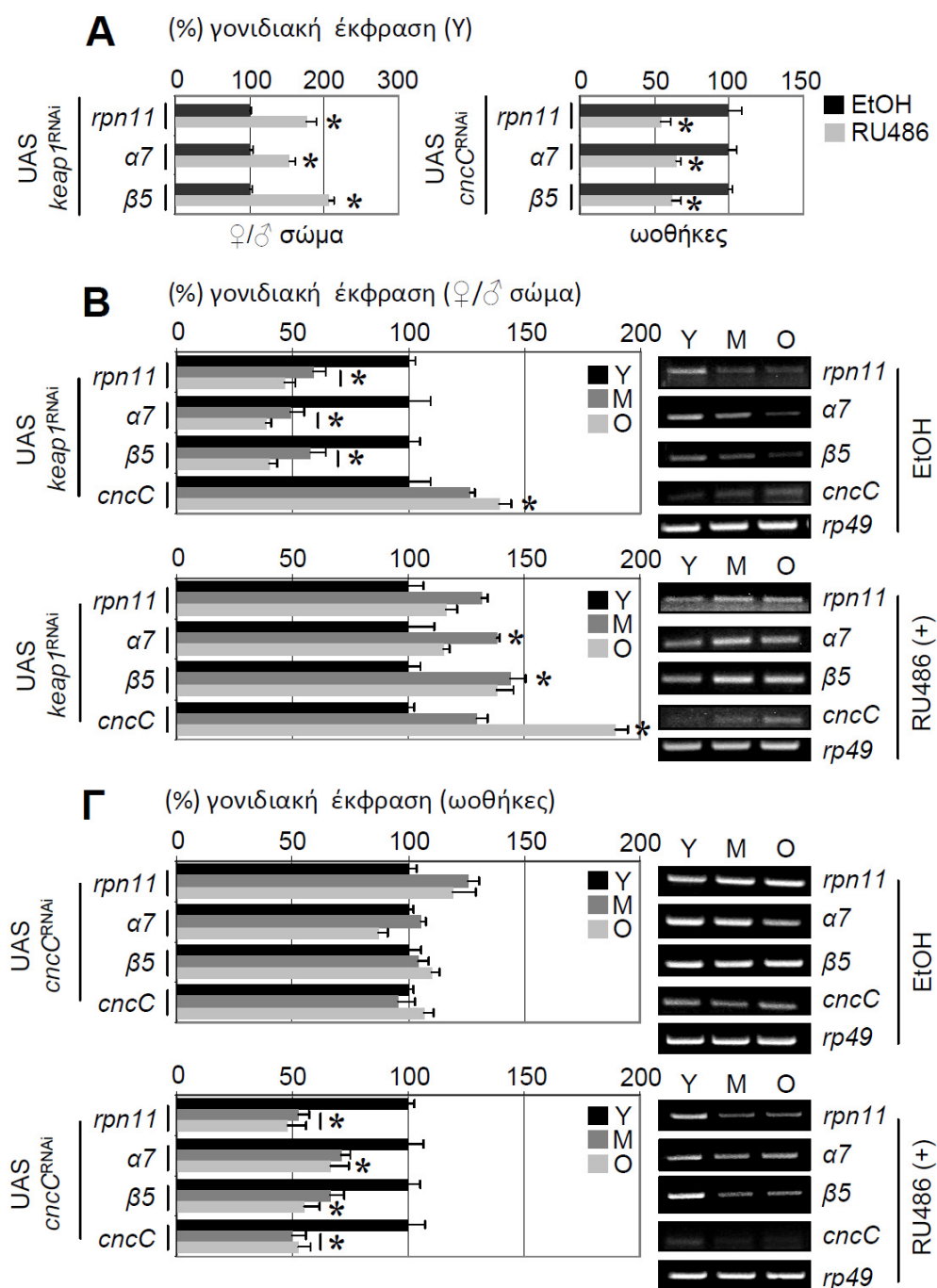
Τα ευρήματά μας έδειξαν ότι, σε σύγκριση με το νεαρό σωματικό ιστό (Εικ 4.11Z1), ο γηρασμένος σωματικός ιστός χάνει την ικανότητα απόκρισης παρουσία οξειδωτικού στρες, καθώς παρατηρήθηκε σημαντικά μικρότερη ενεργοποίηση των στοιχείων αντιοξειδωτικής απόκρισης στο γηρασμένο σωματικό ιστό.

Αντίθετα, οι ωοθήκες από γηρασμένα έντομα φαίνεται να διατηρούν την ικανότητα απόκρισης παρουσία οξειδωτικού στρες εξίσου αποτελεσματικά με τις ωοθήκες από νεαρά έντομα (Εικ. 4.11Z1). Επίσης, οι μελέτες μας έδειξαν ότι οι ωοθήκες διαθέτουν αυξημένα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων *cncC* και *keap1* σε σχέση με το σώμα (Εικ. 4.11Z2). Επομένως, οι ιστοί των γονάδων φαίνεται να διατηρούν λειτουργικό πρωτεάσωμα και λειτουργική αντιοξειδωτική απόκριση παρουσία στρες, ανεξαρτήτως ηλικίας.

4.6 Η μειορρύθμιση της έκφρασης των πρωτεασωμικών γονιδίων στους σωματικούς ιστούς κατά τη γήρανση σχετίζεται με την απώλεια λειτουργικότητας του μονοπατιού σηματοδότησης Nrf2-CncC/Keap1

Δεδομένου ότι ο μοριακός μηχανισμός μειορρύθμισης της έκφρασης των πρωτεασωμικών γονιδίων που εμφανίζεται κυρίως στους σωματικούς ιστούς κατά τη γήρανση παρέμενε άγνωστος και καθώς σύμφωνα με τα ευρήματά μας οι ωοθήκες διαθέτουν πιο ανθεκτική αντιοξειδωτική άμυνα και υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2-CncC σε σχέση με το σώμα, μελετήθηκε αν το μονοπάτι σηματοδότησης Nrf2-CncC/Keap1 εμπλέκεται στη ρύθμιση του πρωτεασώματος κατά τη γήρας. Έτσι, μελετήθηκε η γονιδιακή έκφραση των κύριων πρωτεασωμικών υπομονάδων σε νεαρά, μέσης ηλικίας και γηρασμένα διαγονιδιακά έντομα, στα οποία είχε κατασταλεί το μονοπάτι Nrf2-CncC/Keap1 μέσω RNAi-επαγόμενης καταστολής της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2-CncC. Σε συμπληρωματικές μελέτες χρησιμοποιήθηκαν έντομα, τα οποία έφεραν ενεργοποιημένο το ενδογενές μονοπάτι Nrf2-CncC/Keap1 μέσω RNAi-επαγόμενης καταστολής της έκφρασης του αναστολέα του μεταγραφικού παράγοντα

Nrf2-CncC δηλαδή της πρωτεΐνης Keap1. Στις μελέτες αυτές η έκφραση των διαγονιδίων είναι επαγόμενη, δηλαδή η έκφραση του διαγονιδίου ενεργοποιείται μετά τη χορήγηση της ορμόνης RU486 (βλέπε Υλικά κα Μέθοδοι).



Εικόνα 4.12 Η ενεργοποίηση του ενδογενούς μεταγραφικού παράγοντα Nrf2/CncC (μέσω της καταστολής της έκφρασης της πρωτεΐνης *Keap1*) σε ενήλικα έντομα κατήργησε τη μειорύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων στους σωματικούς ιστούς κατά τη γήρανση• αντίθετα η καταστολή της έκφρασης του Nrf2/CncC οδήγησε στη μειорύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων στις ωοθήκες γηρασμένων εντόμων. *A)* Σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων *rpn11*, *α7*, και *β5* στους σωματικούς ιστούς (αριστερό τμήμα) και στις ωοθήκες (δεξιό τμήμα) από νεαρά (Y) διαγονιδιακά έντομα που είχαν κατασταλαμένη την έκφραση της πρωτεΐνης Keap1 (RNAi *keap1*) (αριστερό τμήμα) ή

του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2/CncC (*RNAi cncC*) (δεξιό τμήμα). Η ορμόνη RU486 χορηγήθηκε στα έντομα για 7 ημέρες. Στα έντομα μάρτυρες χορηγήθηκε 80% αιθανόλη (διαλύτης της ουσίας RU486). (B, Γ) Σχετική ποσοτικοποίηση (%) της έκφρασης των γονιδίων *rpn11*, *a7*, *β5* και *cncC* (αριστερό τμήμα) και αντιπροσωπευτικά πηκτώματα αγαρόζης (δεξιό τμήμα) σε σωματικούς ιστούς (B) και ωοθήκες (Γ) από νεαρά (Y), μέσης ηλικίας (M), και γηρασμένα (O) διαγονιδιακά έντομα που είχαν κατασταλαμμένη είτε την έκφραση της πρωτεΐνης Kead1 (B) είτε του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2/CncC (Γ). Σε όλες τις περιπτώσεις στα έντομα μάρτυρες χορηγήθηκε EtOH και η έκφραση του διαγονιδίου ενεργοποιήθηκε με τη χορήγηση της ορμόνης RU486. Η ηλικία των νεαρών εντόμων ήταν στο 15% του συνολικού προσδόκιμου ζωής τους, των μέσης ηλικίας εντόμων ήταν στο 45–55% του συνολικού προσδόκιμου ζωής τους και των γηρασμένων εντόμων στο 80% του συνολικού προσδόκιμου ζωής τους. Η τιμή 100% στα διαγράμματα αφορά στα νεαρά έντομα. Τυπική απόκλιση $\pm$ SD, *, $P < 0.05$.

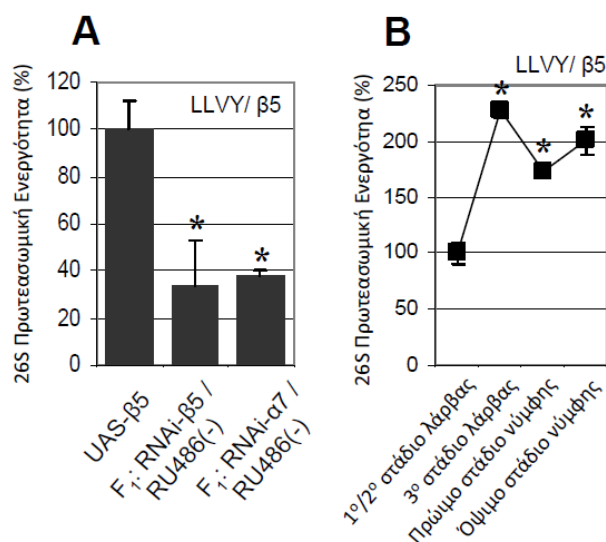
Όπως φαίνεται στην Εικ. 4.12A, αρχικά διαπιστώθηκε ότι η καταστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης Kead1 οδήγησε σε αύξηση της γονιδιακής έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων Rpn11, *a7* και *β5* στους σωματικούς ιστούς νεαρών διαγονιδιακών εντόμων, ενώ η καταστολή της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2/CncC οδήγησε σε μείωση της γονιδιακής έκφρασης των ίδιων πρωτεασωμικών υπομονάδων στις ωοθήκες νεαρών διαγονιδιακών εντόμων. Στη συνέχεια, παρατηρήθηκε ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού Nrf2-CncC/Kead1, καθ' όλη τη διάρκεια ζωής των εντόμων, οδήγησε στη διατήρηση υψηλών επιπέδων έκφρασης των πρωτεασωμικών γονιδίων στους σωματικούς ιστούς κατά τη γήρανση (Εικ. 4.12B). Επίσης βρέθηκε ότι η καταστολή του μονοπατιού σηματοδότησης Nrf2-CncC/Kead1 οδήγησε σε μείωση της έκφρασης των πρωτεασωμικών γονιδίων στις γηρασμένες γονάδες (Εικ. 4.12B). Επομένως, συμπεραίνουμε πως το μονοπάτι Nrf2-CncC/Kead1 έχει καθοριστικό ρόλο στη διαφορική ρύθμιση της πρωτεόστασης στο σωματικό και αναπαραγωγικό ιστό κατά τη γήρανση.

4.7 Η RNAi-επαγόμενη καταστολή της έκφρασης των υπομονάδων *β5* και *a7* του 20S πρωτεασώματος, μέσω RNAi, προκαλεί μείωση της ενεργότητας του πρωτεασώματος και θνησιμότητα σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια

Δεδομένης της παρατηρηθείσας μείωσης της ενεργότητας του πρωτεασώματος κατά τη γήρανση, στη συνέχεια μελετήθηκαν οι επιπτώσεις στη φυσιολογία του οργανισμού μετά από μείωση της πρωτεασωμικής ενεργότητας σε νεαρά άτομα στα επίπεδα που απαντώνται στα γηρασμένα άτομα. Αρχικά, το παραπάνω ερώτημα προσεγγίστηκε με γενετικό τρόπο.

Δεδομένου ότι οι περισσότερες υπάρχουσες μελέτες αφορούν κυρίως στην καταστολή του 19S πρωτεασώματος, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά στελέχη, στα οποία, μετά τη χορήγηση της ορμόνης RU486, επάγεται η καταστολή της έκφρασης των

πρωτεασωμικών υπομονάδων β5 και α7 (20S πρωτεάσωμα) μέσω RNAi. Βρέθηκε ότι, οι λάρβες της F1 γενιάς (και στα δύο στελέχη) που αναπτύχθηκαν απουσία της ορμόνης RU486 εμφάνισαν μειωμένο μέγεθος και τελικά πέθαναν στο 2^ο ή 3^ο στάδιο της λάρβας. Το εύρημα αυτό έδειξε ότι το συγκεκριμένο σύστημα διαγένεσης εμφανίζει διαρροή έκφρασης. Δηλαδή, χωρίς την προσθήκη της ορμόνης RU486 υπάρχει ήπια έκφραση του διαγονιδίου• το εύρημα αυτό έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Ford et al., 2007). Σε συμφωνία με τα παραπάνω, οι λάρβες της F1 γενιάς εμφάνισαν μείωση της ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος απουσία RU486 (Εικ. 4.13Α). Εντονότερο φαινόμενο εμφάνισαν οι λάρβες που καλλιεργήθηκαν παρουσία της ορμόνης RU486 (πλήρης επαγωγή του διαγονιδίου), οι οποίες εμφάνισαν σοβαρό πρόβλημα κινητικότητας και πέθαναν λίγες ώρες μετά την εκκόλαση από το στάδιο εμβρύου.



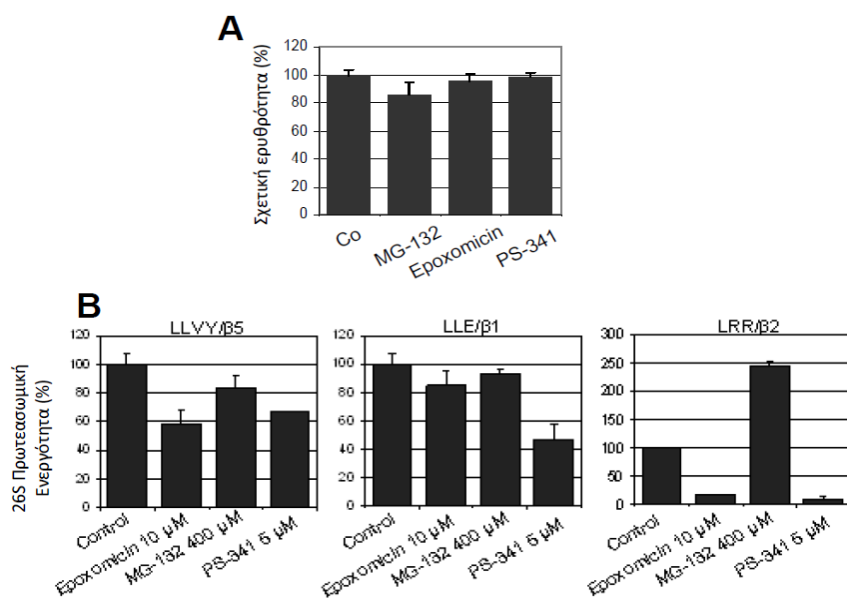
Εικόνα 4.13 Η καταστολή έκφρασης των υπομονάδων β5 και α7 του 20S πρωτεασώματος προκαλεί μείωση της ενεργότητας του πρωτεασώματος και θνησιμότητα σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου. (A) Σχετική (%) 26S πρωτεασωμική ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) σε ολόκληρες λάρβες (1^{ου} και 2^{ου} σταδίου), που είχαν κατασταλαμμένη την έκφραση των πρωτεασωμικών υπομονάδων β5 και α7. Τα δείγματα προήλθαν από διαγονιδιακές λάρβες που καλλιεργήθηκαν απουσία της ορμόνης RU486. **(B)** Σχετική (%) 26S πρωτεασωμική ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) κατά τα αναπτυξιακά στάδια λάρβας και νύμφης αγρίου τύπου εντόμων. Στα διαγράμματα η τιμή 100% αφορά στις μη διαγονιδιακές λάρβες (UAS-β5) (A) και στις λάρβες 1^{ου}-2^{ου} σταδίου (B). Τυπική απόκλιση ± SD, *, P<0.05.

Θεωρήθηκε λοιπόν πως η αυξημένη ενεργότητα του πρωτεασώματος είναι απαραίτητη, προκειμένου να υποστηρίξει την έντονη μιτωτική δραστηριότητα, που εμφανίζεται κατά τα στάδια ανάπτυξης του εντόμου. Για το λόγο αυτό, μετρήθηκε η ενεργότητα χυμοθρυψίνης του πρωτεασώματος στα στάδια της λάρβας και νύμφης του εντόμου αγρίου τύπου. Πράγματι διαπιστώθηκε ότι η ενεργότητα χυμοθρυψίνης αυξάνεται σημαντικά (σε σύγκριση με τα πρώιμα στάδια της λάρβας) τόσο κατά το 3^ο στάδιο της λάρβας όσο και στο στάδιο της νύμφης (Εικ. 4.13B). Το εύρημα αυτό δεικνύει το σημαντικό ρόλο του πρωτεασώματος σε

αυτά τα στάδια ανάπτυξης. Επομένως, η καταστολή του 20S πρωτεασώματος, με γενετικό τρόπο οδηγεί σε θνησιμότητα σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια μη επιτρέποντας να χρησιμοποιηθεί η προσέγγιση αυτή για τη μελέτη της επίδρασης της αναστολής του πρωτεασώματος στη φυσιολογία των ενήλικων ατόμων.

4.8 Η φαρμακολογική αναστολή του πρωτεασώματος σε ενήλικα έντομα προκαλεί διαταραχή της πρωτεόστασης, μείωση της κινητικής ικανότητας, καθώς και δόσο-εξαρτώμενη μείωση του προσδόκιμου ζωής των εντόμων

Δεδομένων των ευρημάτων που αφορούν στην καταστολή της πρωτεασωμικής λειτουργίας με γενετικό τρόπο, αναπτύχθηκε στη συνέχεια ένα φαρμακολογικό μοντέλο αναστολής της πρωτεασωμικής λειτουργίας σε ενήλικα άτομα. Ειδικότερα, χορηγήθηκαν στα έντομα μέσω της τροφής ειδικοί αναστολείς του πρωτεασώματος. Καθώς στο έντερο της *Drosophila* έχει αναφερθεί έκφραση των ενζύμων του κυτοχρώματος P450, τα οποία μεταβολίζουν φαρμακευτικές ουσίες (Jafari et al., 2006), χρησιμοποιήθηκε μια σειρά από διαφορετικούς αναστολείς του πρωτεασώματος (MG-132, Eroxomicin και PS-341).

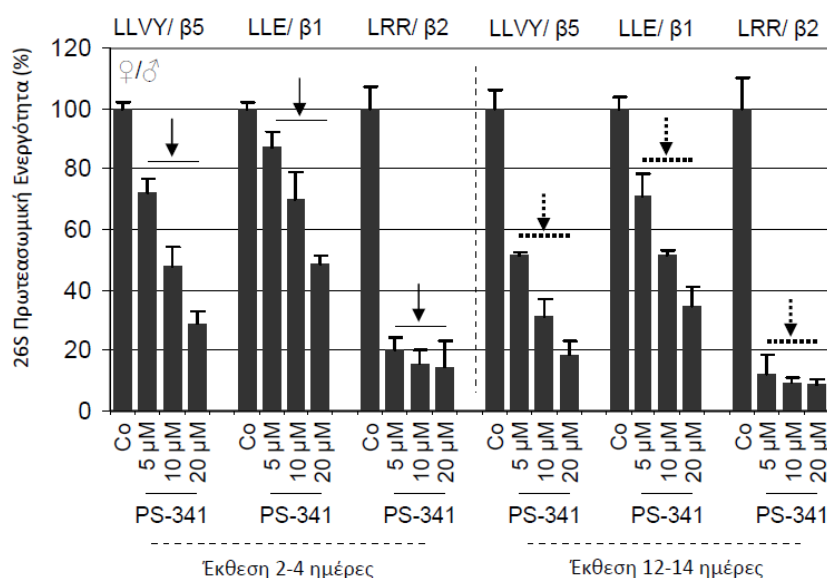


Εικόνα 4.14 Η προσθήκη αναστολέων του πρωτεασώματος στην τροφή των εντόμων δεν επηρεάζει το ρυθμό πρόσληψης τροφής και προκαλεί μείωση της 26S πρωτεασωμικής ενεργότητας. (A) Βαθμός κοιλιακής ερυθρότητας των εντόμων που εκτέθηκαν σε κανονική τροφή και σε τροφή που περιείχε 400 μM MG-132 ή 10 μM Eroxomicin ή 5 μM PS-341. (B) Σχετική (%) 26S πρωτεασωμική ενεργότητα σε σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων που εκτέθηκαν στους πρωτεασωμικούς αναστολείς 400 μM MG-132 ή 10 μM Eroxomicin ή 5 μM PS-341 για 4 ημέρες. Control, δείγμα μάρτυρας. Τυπική απόκλιση ± SD.

Οι μελέτες αυτές έδειξαν, ότι η προσθήκη των αναστολέων του πρωτεασώματος δεν επηρεάζει τη λήψη τροφής των εντόμων (Εικ. 4.14A), καθώς και ότι μέσω αυτής της

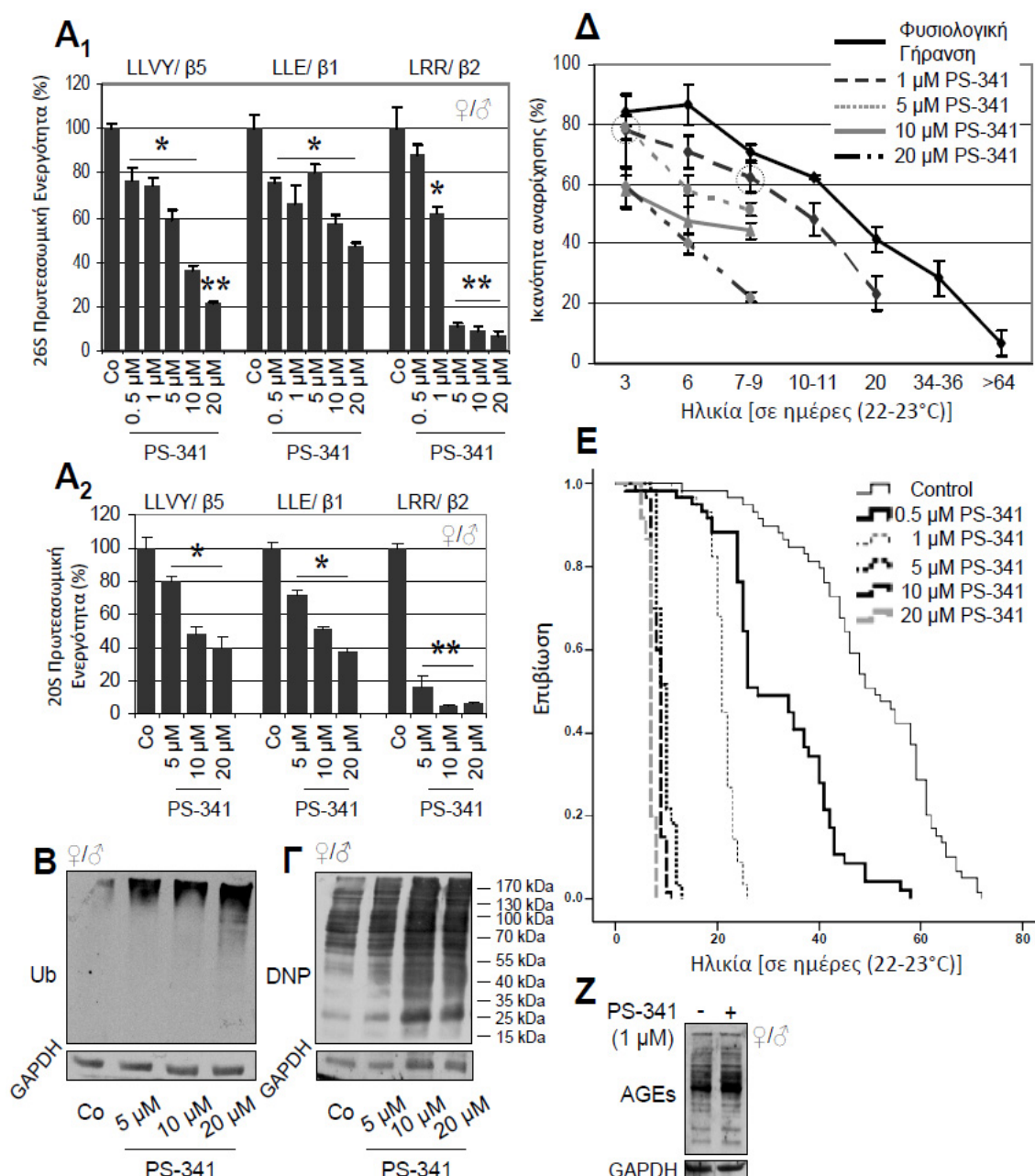
πειραματικής προσέγγισης είναι δυνατή η δοσο-εξαρτώμενη καταστολή της ενεργότητας του πρωτεασώματος• με εξαίρεση την ενεργότητα θρυψίνης (LRR) μετά από προσθήκη του αναστολέα MG-132 (Εικ. 4.14B).

Στη συνέχεια, και καθώς η αποτελεσματικότερη αναστολή της ενεργότητας του πρωτεασώματος επιτεύχθηκε με τον αναστολέα PS-341, εστιάσαμε τη μελέτη μας στον συγκεκριμένο αναστολέα. Ο PS-341 είναι ένας πολύ ειδικός, υδατοδιαλυτός και αντιστρεπτά συνδεδεμένος αναστολέας του πρωτεασώματος, ο οποίος χρησιμοποιείται στη θεραπευτική του καρκίνου για την αντιμετώπιση του πολλαπλού μυελώματος (Dick και Fleming, 2010). Όπως φαίνεται και στην Εικ. 4.15 και 4.16A, η έκθεση νεαρών εντόμων (τόσο θηλυκών όσο και αρσενικών) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναστολέα PS-341 προκαλεί δοσο-εξαρτώμενη μείωση της ενζυμικής ενεργότητας του 26S και 20S πρωτεασώματος στους σωματικούς ιστούς των εντόμων. Η μείωση των ενεργοτήτων είναι δυνατή μέχρι τα επίπεδα που παρατηρούνται στα γηρασμένα άτομα. Να σημειωθεί επίσης ότι η παρατεταμένη έκθεση των νεαρών εντόμων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναστολέα του πρωτεασώματος οδήγησε σε εντονότερη μείωση των πρωτεασωματικών ενεργοτήτων (Εικ. 4.15). Η μείωση της ενεργότητας του πρωτεασώματος συνοδεύτηκε από τη διαταραχή της πρωτεόστασης καθώς παρατηρήθηκε συσσώρευση των ουβικιτινωμένων (Εικ. 4.16B) και των οξειδωμένων πρωτεϊνών (Εικ. 4.16Γ). Επιπλέον, η μερική αναστολή της ενεργότητας του πρωτεασώματος προκάλεσε μείωση της μυϊκής δύναμης των εντόμων (όπως αυτή μετρήθηκε με τη δοκιμή αναρρίχησης) (Εικ. 4.16Δ) και τελικά τη δοσο- εξαρτώμενη μείωση του προσδόκιμου ζωής (πρώιμη γήρανση) (Εικ. 4.16Ε).



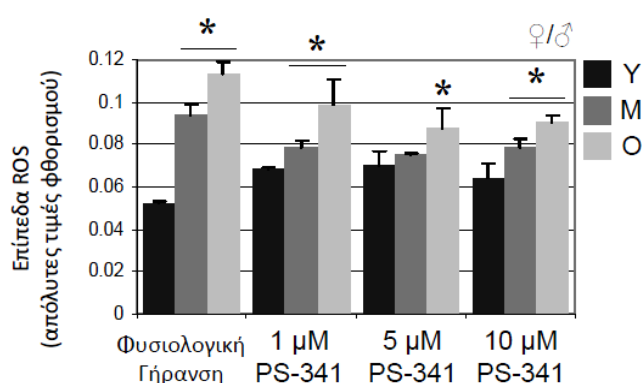
Εικόνα 4.15 Χρονο- εξαρτώμενη επίδραση του πρωτεασωματικού αναστολέα PS-341 στους σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων. Σχετική (%) 26S πρωτεασωματική ενεργότητα σε σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων που εκτέθηκαν στον αναστολέα PS-341 (5 – 20 μM) για 2-4 ημέρες και για 12-14 ημέρες. Co, δείγμα μάρτυρας. Τυπική απόκλιση ± SD.

Η μείωση του προσδόκιμου ζωής συνοδεύτηκε, επίσης, από τη συσσώρευση των πρωτεϊνών που έχουν τροποποιηθεί με AGEs (Εικ. 4.16Z). Οι τροποποιήσεις αυτές πρόσφατα προτάθηκαν και ως βιοδείκτης γήρανσης στη *Drosophila* (Jacobson et al., 2010). Επίσης, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του οξειδωτικού στρες (ROS) με ρυθμό αύξησης, που είναι παρόμοιος με το ρυθμό αύξησης των ROS που παρατηρήθηκε κατά τη φυσιολογική γήρανση (Εικ. 4.17). Επομένως, η μερική καταστολή της ενεργότητας του πρωτεασώματος προκαλεί επαγωγή βιοδεικτών πρόωμης γήρανσης.



Εικόνα 4.16 Η παρατεταμένη έκθεση στον πρωτεασωμικό αναστολέα PS-341 προκαλεί στους σωματικούς ιστούς των εντόμων διαταραχή της πρωτεόστασης, καθώς και δοσο-εξαρτώμενη μείωση της κινητικής ικανότητας και της μακροβιότητας των εντόμων. (Α) Σχετική (%) 26S (A₁) και 20S (A₂) πρωτεασωματική ενεργότητα στους σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων που εκτέθηκαν στον αναστολέα για 6–9 ημέρες στις συγκεντρώσεις που

αναγράφονται στο διάγραμμα. (B, Γ) Αντιπροσωπευτικό ανοσοστύπωμα ουβικιτινωμένων (Ub) (B) και οξειδωμένων (καρβονυλιωμένων, DNP) (Γ) πρωτεϊνών σε σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων που εκτέθηκαν στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις του αναστολέα για 6-9 ημέρες. (Δ) Κινητική ικανότητα (%) στις αναγραφόμενες ηλικίες των εντόμων κατά τη φυσιολογική γήρανση, και των εντόμων που εκτέθηκαν στον αναστολέα PS-341. (Ε) Καμπύλες μακροβιότητας των εντόμων που εκτέθηκαν στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις στον αναστολέα. Οι μέσοι όροι και οι στατιστικές αναλύσεις των μελετών μακροβιότητας αναφέρονται στο συμπληρωματικό Πίνακα 2 του Παραρτήματος Ι. (Ζ) Αντιπροσωπευτικό ανοσοστύπωμα των πρωτεϊνών που έχουν τροποποιηθεί με AGEs σε σωματικούς ιστούς εντόμων που εκτέθηκαν στον αναστολέα για 17 ημέρες. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για το ισοφόρτωμα. Control, δείγμα μάρτυρας. Τυπική απόκλιση $\pm$ SD, *, $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.



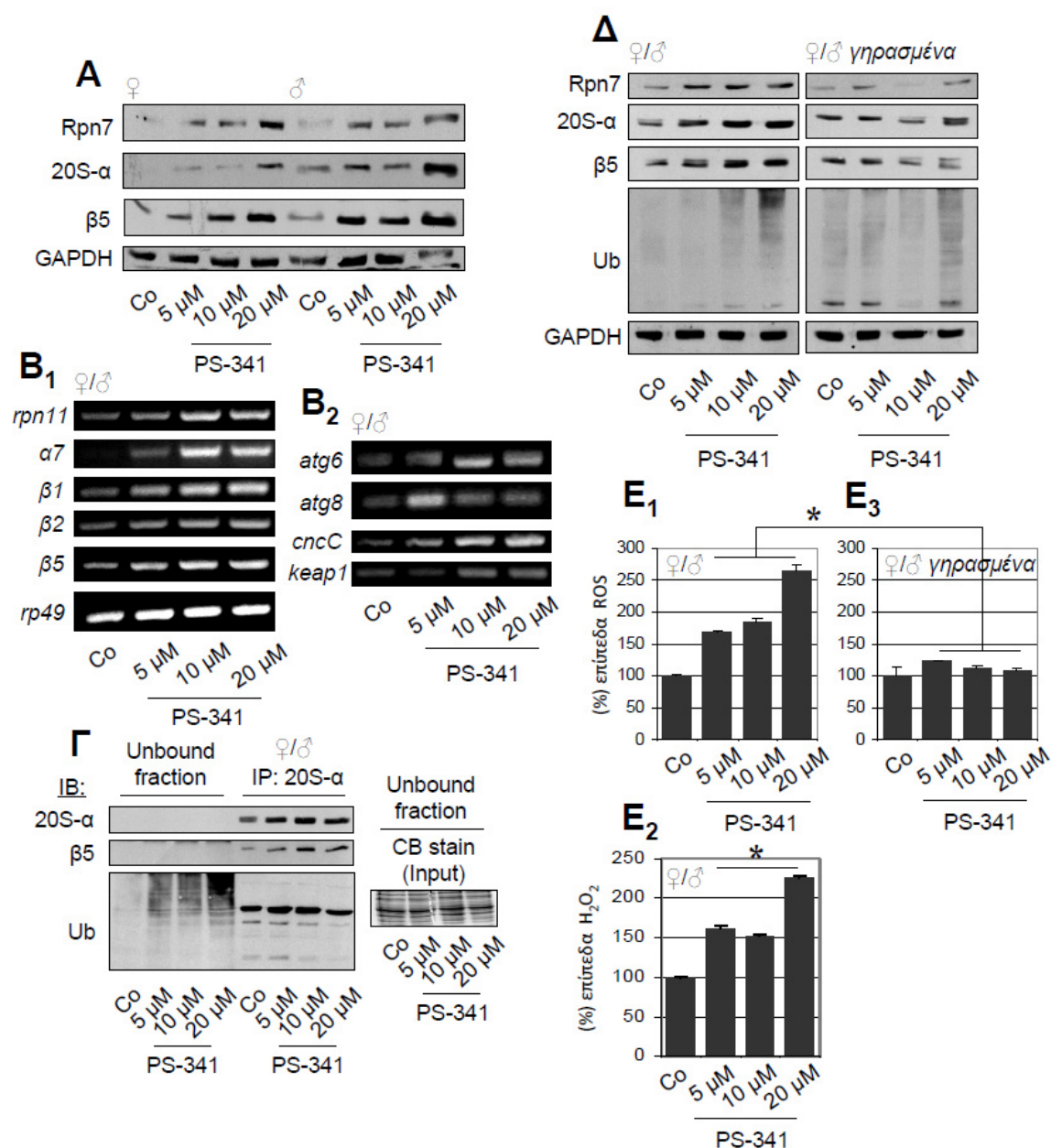
Εικόνα 4.17 Ο ρυθμός αύξησης των επιπέδων ROS σε έντομα που εκτέθηκαν στον αναστολέα του πρωτεασώματος PS-341 είναι παρόμοιος με το ρυθμό αύξησης των ROS κατά τη φυσιολογική γήρανση. Μονάδες φθορισμού ανά μ g πρωτεΐνης από σωματικούς ιστούς νεαρών (Y), μέσης ηλικίας (M) και γηρασμένων (O) αγρίου τύπου εντόμων, που είτε εκτέθηκαν στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις του αναστολέα είτε όχι. Τυπική απόκλιση $\pm$ SD, *, $P < 0.05$.

4.9 Η μερική αναστολή της πρωτεασωμικής ενεργότητας προκαλεί επαγωγή της γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων με ηλικιο- και ιστο- εξαρτώμενο τρόπο

Ακολούθως, αναλύθηκαν οι μοριακές-κυτταρικές επιπτώσεις μετά από μερική αναστολή της πρωτεασωμικής λειτουργίας. Βρέθηκε ότι η δυσλειτουργία του πρωτεασώματος σε νεαρά έντομα προκαλεί τη δοσο- εξαρτώμενη επαγωγή της γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης των κύριων πρωτεασωμικών υπομονάδων στους σωματικούς ιστούς των εντόμων (Εικ. 4.18A,B1)• η παρατήρηση αυτή συνάδει με το εύρημα της αύξησης αυτοσυγκροτημένων πρωτεασωμάτων (Εικ. 4.18Γ). Βρέθηκε επίσης ότι η υπολειτουργία του πρωτεασώματος ενεργοποιεί μια γενικευμένη επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη διατήρηση της πρωτεόστασης, όπως τα αυτοφαγικά γονίδια *atg6* και *atg8*, καθώς και τα γονίδια αντιοξειδωτικής απόκρισης *Nrf2/cncC* και *keap1* (Εικ. 4.18B2). Παρατηρήθηκε επίσης ότι όταν εκτέθηκαν γηρασμένα έντομα στον πρωτεασωμικό

αναστολέα (στις ίδιες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα με τα νεαρά έντομα) δεν παρατηρήθηκε επαγωγή της έκφρασης των πρωτεασωματικών υπομονάδων (Εικ. 4.18Δ).

Στη συνέχεια, η μελέτη επικεντρώθηκε στην εύρεση του μοριακού μηχανισμού που κινητοποιεί την επαγωγή της έκφρασης του πρωτεασώματος αλλά και των άλλων κυτταρικών συστημάτων που συμμετέχουν στη διατήρηση της πρωτεόστασης.



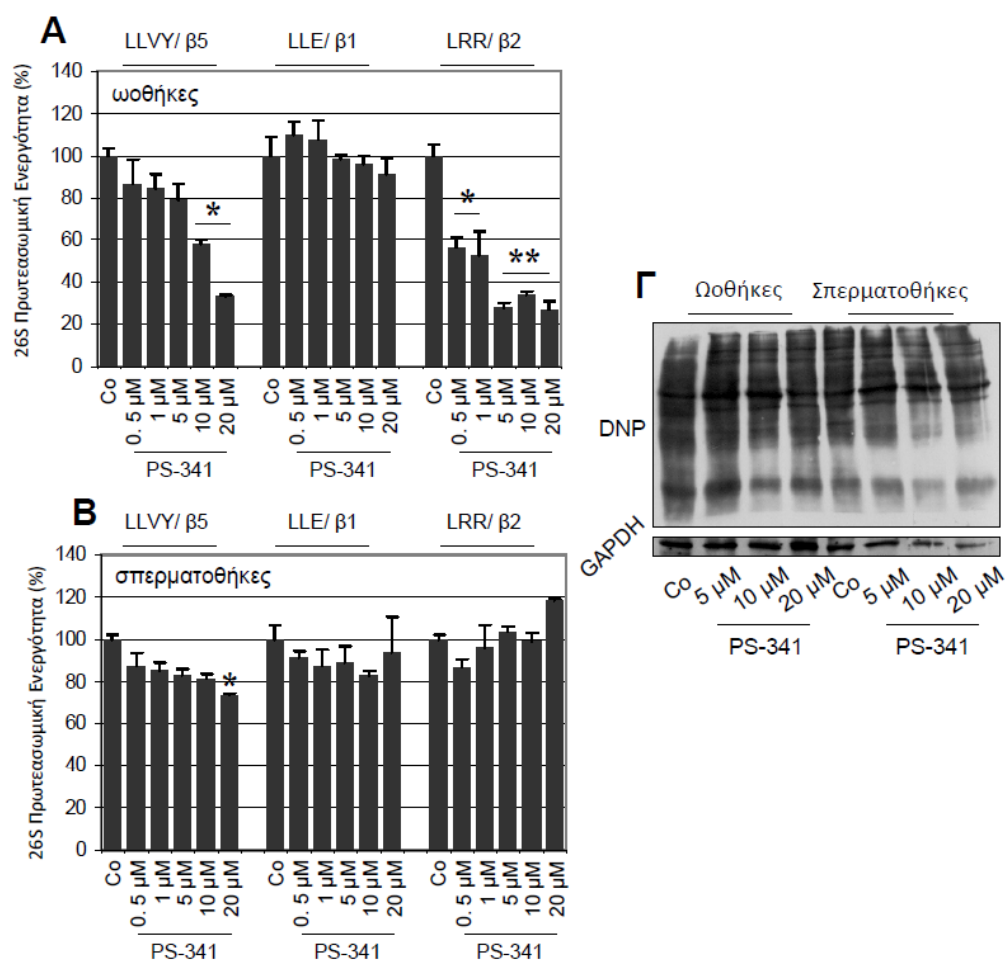
Εικόνα 4.18 Η αναστολή του πρωτεασώματος σε σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων προκαλεί δόσο- εξαρτώμενη επαγωγή της γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεασωματικών υπομονάδων και των αυτοσυγκροτημένων πρωτεασωμάτων, καθώς και αύξηση του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου. (A) Αντιπροσωπευτικό ανοσοστύπωμα έναντι των πρωτεϊνών Rpn7, 20S-α, και β5 σε δείγματα από σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων (θηλυκών και αρσενικών) που εκτέθηκαν στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις του αναστολέα του πρωτεασώματος PS-341 για 4 ημέρες. (B) Αντιπροσωπευτική ανάλυση της

έκφρασης των (B₁) πρωτεασωμικών γονιδίων *rpn11*, *a4*, *a7*, *β1*, *β2* και *β5* και των (B₂) γονιδίων *atg6*, *atg8*, *cncC*, *keap1* στους σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων μετά από πρωτεασωμική αναστολή όπως στο (A). (Γ) Ανοσοκατακρήμνιση (IP) του 20S πρωτεασώματος με αντίσωμα έναντι των α υπομονάδων (20S-α) και ανοσοεντόπιση (WB) με αντίσωμα έναντι των α υπομονάδων και της β5 υπομονάδας (που υποδηλώνει την ύπαρξη αυτοσυγκροτημένου πρωτεασώματος), και έναντι της ουβικιτίνης (Ub) σε κυτταρικό λύμα από σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων που εκτέθηκαν στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις του αναστολέα για 4 ημέρες. Η χρωστική coomassie blue (C.B.) αφορά στο ισοφόρτωμα πρωτεΐνης. (Δ) Συγκριτική ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης σε σωματικούς ιστούς από νεαρά (♂, ♀) και γηρασμένα (♂, ♀ γηρασμένα) έντομα που εκτέθηκαν για 4 ημέρες στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις του αναστολέα, έναντι των πρωτεϊνών Rpn7, 20S-α, β5 και Ub. (Ε) Σχετικά (%) επίπεδα ROS (E1, E3) και H₂O₂ (E2) στους σωματικούς ιστούς από νεαρά (E1, E2) και γηρασμένα (E3) έντομα που εκτέθηκαν στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις του PS-341 για 4 ημέρες. Οι τιμές 100% αφορούν σε δείγματα μάρτυρες. Σε απόλυτη τιμή τα γηρασμένα έντομα είχαν αυξημένα ενδογενή επίπεδα ROS και H₂O₂ σε σύγκριση με τα νεαρά έντομα. Το γονίδιο *rp49* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς και η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς ισοφορτώματος. Co, δείγμα μάρτυρας. Τυπική απόκλιση ± SD, *, P<0.05.

Μια σειρά από προκαρκινικές παρατηρήσεις που αφορούν στην απάντηση του παραπάνω ερωτήματος ήταν οι παρακάτω: (i) η επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2/CncC μετά την μερική αναστολή του πρωτεασώματος (Εικ. 4.18B2) και, (ii) το γεγονός ότι η δυσλειτουργία του πρωτεασώματος οδήγησε στην αύξηση του κυτταρικού οξειδωτικού στρες (ROS) (Εικ. 4.18E1), καθώς και των επιπέδων H₂O₂ (Εικ. 4.18E2) στους σωματικούς ιστούς των νεαρών εντόμων. Σε αντίθεση με τα ευρήματα αυτά, στους σωματικούς ιστούς των γηρασμένων εντόμων δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση οξειδωτικού στρες (Εικ. 4.18E3). Επομένως, η δυσλειτουργία του πρωτεασώματος στα νεαρά έντομα φαίνεται πως προκαλεί αύξηση του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου.

Δεδομένου ότι κατά τη “φυσιολογική γήρανση”, σύμφωνα με τις μελέτες μας, η ρύθμιση του πρωτεασώματος είναι διαφορετική ανάμεσα στους σωματικούς ιστούς και τις γονάδες του εντόμου (βλέπε παραπάνω), μελετήθηκαν οι μοριακές-κυτταρικές επιπτώσεις της μερικής αναστολής του πρωτεασώματος στις ωοθήκες και σπερματοθήκες των εντόμων που εκτέθηκαν στον πρωτεασωμικό αναστολέα PS-341.

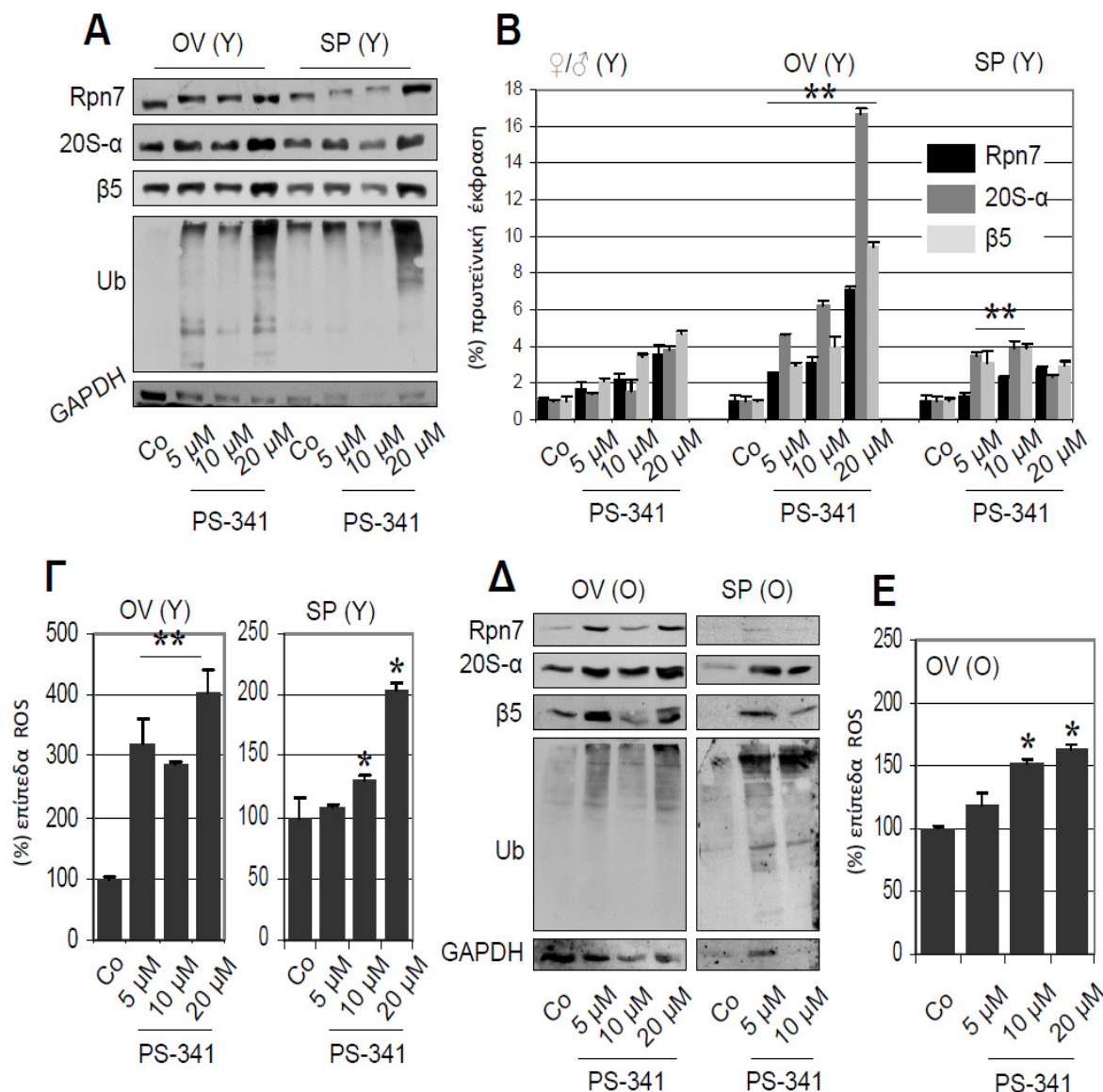
Όπως και στους σωματικούς ιστούς, παρατηρήθηκε μείωση της 26S πρωτεασωμικής ενεργότητας στους ιστούς των γονάδων, αν και τα επίπεδα μείωσης της πρωτεασωμικής ενεργότητας ήταν πολύ μικρότερα σε σύγκριση με τους σωματικούς ιστούς. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσσώρευση οξειδωμένων πρωτεϊνών (Εικ. 4.19).



Εικόνα 4.19 Οι ωοθήκες και οι σπερματοθήκες είναι σχετικά πιο ανθεκτικές (σε σύγκριση με το σωματικό ιστό) στην πρωτεασωμική αναστολή. (Α,Β) Σχετική (%) 26S πρωτεασωμική ενεργότητα σε ωοθήκες (Α) και σπερματοθήκες (Β) από νεαρά έντομα που εκτέθηκαν στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις του πρωτεασωμικού αναστολέα PS-341 για 4 ημέρες. (Γ) Αντιπροσωπευτικό ανοσοστύπωμα των οξειδωμένων πρωτεϊνών από ωοθήκες και σπερματοθήκες νεαρών εντόμων που εκτέθηκαν στον αναστολέα όπως στο (Α, Β). Co, δείγμα μάρτυρας. Τυπική απόκλιση $\pm$ SD, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Από το παραπάνω εύρημα προκύπτει πως οι γονάδες εμφανίζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε ενδεχόμενη πρωτεασωμική δυσλειτουργία. Η παρατήρηση αυτή υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι οι γονάδες εμφάνισαν εντονότερη επαγωγή της γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων σε σύγκριση με τους σωματικούς ιστούς μετά από μερική αναστολή του πρωτεασώματος σε νεαρά άτομα (Εικ. 4.20Α,Β). Επιπλέον, (όπως παρατηρήθηκε και στους νεαρούς σωματικούς ιστούς) η αναστολή του πρωτεασώματος οδήγησε σε αύξηση του οξειδωτικού φορτίου (ROS) τόσο στις ωοθήκες όσο και στις σπερματοθήκες (Εικ. 4.20Γ). Παρόλα αυτά, τα αυξημένα επίπεδα ROS στις γονάδες δε συνδυάστηκαν με αυξημένα επίπεδα οξειδωμένων πρωτεϊνών (Εικ. 4.19Γ). Βρέθηκε επίσης, ότι οι γονάδες από γηρασμένα έντομα τα οποία εκτέθηκαν στον αναστολέα του πρωτεασώματος, εμφάνισαν επαγωγή της έκφρασης των πρωτεασωμικών

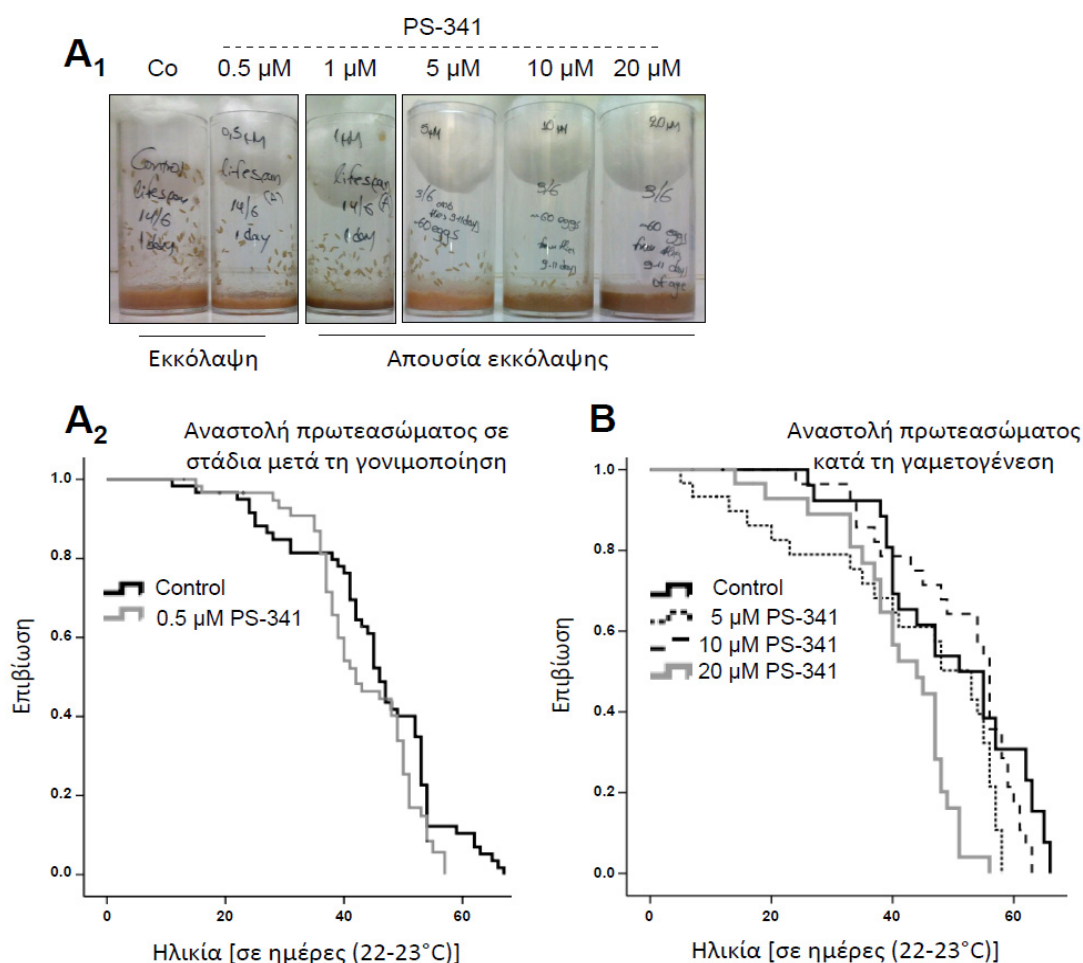
υπομονάδων (Εικ. 4.20Δ) καθώς και αύξηση των επιπέδων ROS (Εικ. 4.20Ε), όπως είχε παρατηρηθεί και στα νεαρά άτομα.



Εικόνα 4.20 Η μερική αναστολή της πρωτεασωμικής λειτουργίας προκαλεί την έντονη επαγωγή των πρωτεασωμικών υπομονάδων στις γονάδες τόσο από νεαρά όσο και από γηρασμένα έντομα. (Α) Αντιπροσωπευτικό ανοσοστύψωμα έναντι των πρωτεασωμικών υπομονάδων Rpn7, 20S-α, B5 και της ουβικιτίνης (Ub) σε ωθήκες (OV) και σπερματοθήκες (SP) από νεαρά (Y) έντομα, που εκτέθηκαν στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις του πρωτεασωμικού αναστολέα PS-341 για 4 ημέρες. (Β) Συγκριτική ανάλυση ποσοτικοποίησης της σχετικής πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων σε σωματικούς ιστούς (♂,♀), στις ωθήκες (OV) και στις σπερματοθήκες (SP) από νεαρά έντομα (Y), που εκτέθηκαν στον αναστολέα, όπως στην περίπτωση (Α). (Γ) Σχετικά επίπεδα (%) ROS σε ωθήκες (OV) και σπερματοθήκες (SP) από νεαρά έντομα (Y) που εκτέθηκαν στον αναστολέα, όπως στην περίπτωση (Α). (Δ) Αντιπροσωπευτικό ανοσοστύψωμα έναντι των πρωτεασωμικών υπομονάδων Rpn7, 20S-α, B5 και της ουβικιτίνης (Ub) σε ωθήκες (OV) και σπερματοθήκες (SP) από γηρασμένα (O) έντομα, που εκτέθηκαν στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις του πρωτεασωμικού αναστολέα, όπως στην περίπτωση (Α). (Ε) Σχετικά επίπεδα (%) ROS σε ωθήκες (OV) από γηρασμένα έντομα (O) που εκτέθηκαν στον

αναστολέα, όπως στην περίπτωση (Α). Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για το ισοφόρτωμα. Co, δείγμα μάρτυρας. Τυπική απόκλιση $\pm$ SD, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της πρωτεασωμικής αστάθειας κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια μέσω μερικής αναστολής του πρωτεασώματος στο προσδόκιμο των ενήλικων ατόμων. Για το σκοπό αυτό, ελέγχθηκε η επίδραση της μερικής αναστολής της ενεργότητας του πρωτεασώματος είτε κατά τη γαμετογένεση είτε κατά τα στάδια ανάπτυξης από την απόθεση του εμβρύου έως την εκκόλαψη του εντόμου, στη μακροβιότητα των ενήλικων εντόμων (Εικ. 4.21).



Εικόνα 4.21 Επίδραση της μερικής αναστολής του πρωτεασώματος κατά τη γαμετογένεση και κατά τα στάδια ανάπτυξης από την απόθεση του εμβρύου ως την εκκόλαψη του εντόμου. (Α1) Σωλήνες καλλιέργειας του πειράματος έκθεσης των σταδίων ανάπτυξης από την απόθεση του εμβρύου ως την εκκόλαψη του ενήλικου εντόμου στον πρωτεασωμικό αναστολέα PS-341 (συγκεντρώσεις 0.5 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M και 20 μ M). Εκκόλαψη ενήλικων εντόμων παρατηρήθηκε μόνο στη συγκέντρωση 0.5 μ M. (Α2) Καμπύλες μακροβιότητας των εντόμων που εκκολάφθηκαν από τη συγκέντρωση 0.5 μ M του αναστολέα και των εντόμων μάρτυρες. (Β) Καμπύλες μακροβιότητας των εντόμων που το στάδιο της γαμετογένεσής τους πραγματοποιήθηκε παρουσία του πρωτεασωμικού αναστολέα σε συγκεντρώσεις 5 μ M, 10 μ M και 20 μ M. Οι μέσοι όροι και οι στατιστικές αναλύσεις των καμπύλων μακροβιότητας αναγράφονται στον συμπληρωματικό Πίνακα 2 του παραρτήματος Ι. Co ή Control, άτομα μάρτυρες.

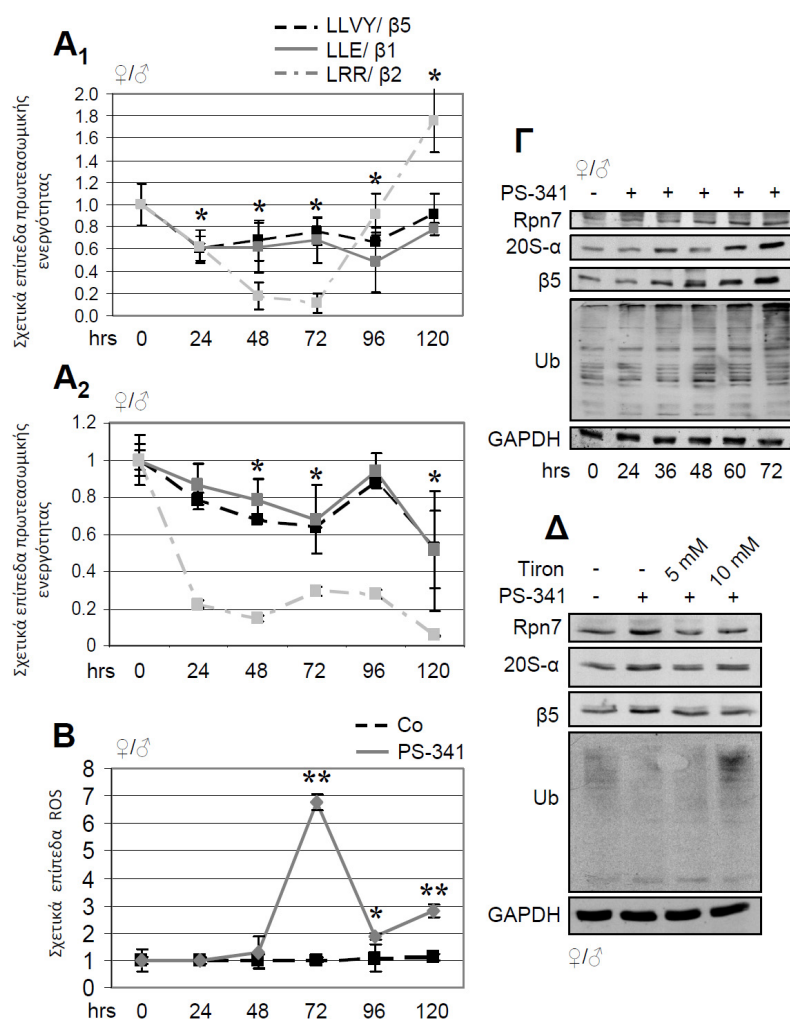
Σε συμφωνία με τα πειράματα γενετικής καταστολής (μέσω RNAi) της έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων β5 και α7, διαπιστώσαμε ότι τα στάδια ανάπτυξης του εντόμου, από την απόθεση του εμβρύου ως την εκκόλαψη του εντόμου είναι εξαιρετικά ευαίσθητα ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις του αναστολέα του πρωτεασώματος (Εικ. 4.21Α1). Συγκεκριμένα, εκκόλαψη ενήλικων εντόμων πραγματοποιήθηκε μόνο στη συγκέντρωση 0.5 μΜ PS-341. Σε αντίθεση με το παραπάνω εύρημα, οι γονάδες εμφανίστηκαν πιο ανθεκτικές παρουσία του πρωτεασωμικού αναστολέα, καθώς τα έμβρυα που αποτέθηκαν από τα έντομα, στα οποία η γαμετογένεση πραγματοποιήθηκε παρουσία του αναστολέα κατάφεραν να φτάσουν επιτυχώς στο στάδιο εκκόλαψης ενήλικων εντόμων και στη συνέχεια, εμφάνισαν μια ήπια μείωση του προσδόκιμου ζωής τους (Εικ. 4.21Β).

Συμπερασματικά, η πρωτεασωμική υπολειτουργία σε νεαρά άτομα πυροδοτεί την ενεργοποίηση ενός ρυθμιστικού δικτύου γονιδιακής έκφρασης, προκειμένου να επανέλθει σε φυσιολογικά επίπεδα η λειτουργία του πρωτεασώματος. Αυτό το δίκτυο γονιδιακής ρύθμισης, δε φαίνεται να είναι λειτουργικό στους σωματικούς ιστούς γηρασμένων ατόμων. Στις γονάδες, αυτή η κυτταρική σηματοδότηση είναι πιο ενεργή σε σύγκριση με τους σωματικούς ιστούς και παραμένει ενεργή και κατά τη γήρανση.

4.10 Η πρωτεασωμική δυσλειτουργία σηματοδοτείται από την αύξηση του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου (ROS) εξαιτίας της διαταραχής της μιτόστασης

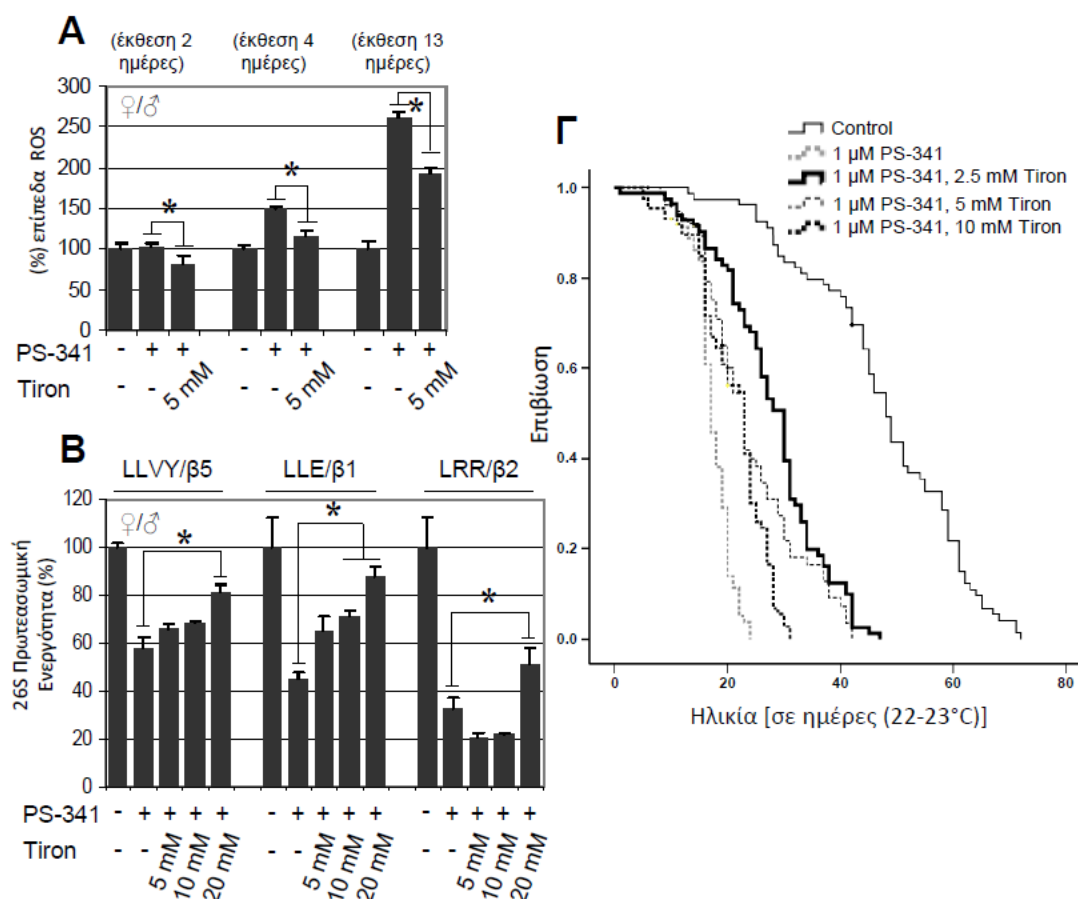
Τα μοριακά-κυτταρικά γεγονότα που σηματοδοτούν την πρωτεασωμική δυσλειτουργία και την ενεργοποίηση του ρυθμιστικού δικτύου έκφρασης των πρωτεασωμικών γονιδίων παράμεναν άγνωστα. Δεδομένης της αύξησης των ROS που παρατηρήθηκε μετά από μερική αναστολή της ενεργότητας του πρωτεασώματος τόσο στους νεαρούς σωματικούς ιστούς όσο και στις γονάδες (ανεξαρτήτως ηλικίας), υποθέσαμε ότι η αύξηση των ROS πιθανόν σηματοδοτεί την πρωτεασωμική δυσλειτουργία. Προκειμένου να ελεγχθεί πειραματικά η υπόθεση αυτή, μετρήθηκαν οι τρεις ενζυματικές ενεργότητες του 26S και 20S πρωτεασώματος, καθώς και τα επίπεδα των ROS στους σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων που εκτέθηκαν στον πρωτεασωμικό αναστολέα PS-341 για διάφορα χρονικά διαστήματα (24, 36, 48, 60, 72, 96 και 120 ώρες). Σε όλα τα χρονικά διαστήματα παρατηρήθηκε μείωση της ενεργότητας του 20S και 26S πρωτεασώματος (με εξαίρεση την ενεργότητα θρυψίνης-LRR στη χρονική στιγμή των 120 ωρών) (Εικ. 4.22Α). Παρόλα αυτά, η αύξηση του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου (ROS) παρατηρήθηκε μετά τις 48-96 ώρες (Εικ. 4.22Β)• σημειώνουμε ότι η χρονική αυτή περίοδος συμπίπτει με την αύξηση της έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων (Εικ. 4.22Γ). Η παρατήρηση αυτή δεικνύει ότι πιθανότατα η αύξηση των ROS

είναι αποτέλεσμα της πρωτεασωμικής δυσλειτουργίας. Πράγματι, η αύξηση των ROS βρέθηκε να είναι απαραίτητη για την επαγωγή της έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων, καθώς η παράλληλη έκθεση νεαρών εντόμων τόσο στον αντιοξειδωτικό παράγοντα Tiron (Han και Park, 2009) όσο και στον πρωτεασωμικό αναστολέα PS-341 οδήγησε σε μείωση των επιπέδων ROS (Εικ. 4.23Α) και στην κατάργηση της επαγόμενης υπερέκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων (Εικ. 4.22Γ).



Εικόνα 4.22 Η αύξηση του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου (ROS) μετά από πρωτεασωμική δυσλειτουργία παρατηρείται την 2–4 ημέρα έκθεσης, διάστημα που συσχετίζεται με την επαγωγή της έκφρασης του πρωτεασώματος. (Α, Β) Σχετικά επίπεδα μεταβολής της 26S (Α1) και 20S (Α2) πρωτεασωμικής ενεργότητας και των επιπέδων ROS (Β), στους σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων μετά από έκθεση στον πρωτεασωμικό αναστολέα PS-341 σε συγκέντρωση 1 μ M για τα χρονικά διαστήματα που αναγράφονται στα διαγράμματα. Στα δείγματα μάρτυρες δόθηκε η τιμή 1. (Γ) Αντιπροσωπευτικό ανοσοσύτρωμα έναντι των πρωτεασωμικών υπομονάδων Rpn7, 20S-α, β5 και ουβικιτίνης (Ub) στους σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων μετά από έκθεση στον αναστολέα, όπως στην περίπτωση (Α, Β). (Δ) Αντιπροσωπευτικό ανοσοσύτρωμα έναντι των πρωτεασωμικών υπομονάδων Rpn7, 20S-α, β5 και ουβικιτίνης (Ub) στους σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων που εκτέθηκαν για 3 ημέρες σε 1 μ M PS-341 ή σε 1 μ M PS-341 μαζί με 5–10 mM Tiron. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για το ισοφόρτωμα. Τυπική απόκλιση $\pm$ SD, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

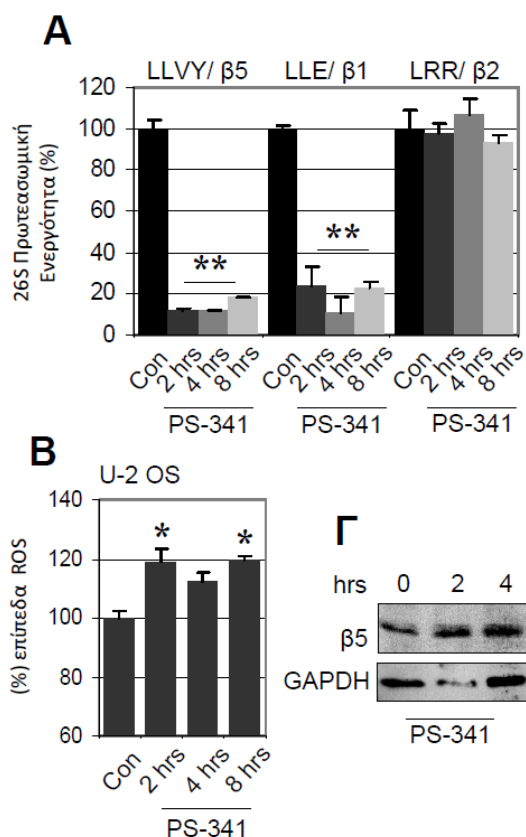
Επίσης, βρέθηκε ότι ο αντιοξειδωτικός παράγοντας Tiron επανέφερε μερικώς την ενεργότητα του πρωτεασώματος (Εικ. 4.23B) και περιορίσε την επίδραση του πρωτεασωμικού αναστολέα στο προσδόκιμο ζωής των εντόμων (Εικ. 4.23Γ), υποδηλώνοντας ότι η συσσώρευση οξειδωτικού στρες επιβαρύνει περαιτέρω (πιθανότατα μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων) τη λειτουργία του πρωτεασώματος και τη φυσιολογία του οργανισμού.



Εικόνα 4.23 Η έκθεση νεαρών εντόμων στον πρωτεασωμικό αναστολέα PS-341 παράλληλα με τον αντιοξειδωτικό παράγοντα Tiron προκαλεί μείωση του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου (ROS), επαναφορά της πρωτεασωμικής ενεργότητας, καθώς και βελτίωση του προσδόκιμου ζωής σε σύγκριση με την έκθεση των εντόμων μόνο σε PS-341. (A) Σχετικά (%) επίπεδα ROS σε σωματικούς ιστούς από νεαρά έντομα που εκτέθηκαν σε 1 μM PS-341 ή σε 1 μM PS-341 μαζί με 5 mM Tiron για 2, 4 και 13 ημέρες. (B) Σχετική (%) 26S πρωτεασωμική ενεργότητα σε σωματικούς ιστούς από νεαρά έντομα που εκτέθηκαν σε 1 μM PS-341 ή σε 1 μM PS-341 παράλληλα με 5 mM, 10 mM ή 20 mM Tiron για 13 ημέρες. (Γ) Καμπύλες μακροβιότητας εντόμων που καλλιιεργήθηκαν παρουσία 1 μM PS-341 ή 1 μM PS-341 μαζί με 2.5 mM, 5 mM ή 10 mM Tiron. Οι μέσοι όροι και οι στατιστικές αναλύσεις των καμπύλων μακροβιότητας αναφέρονται στον συμπληρωματικό Πίνακα 2 του παραρτήματος I. Control, άτομα μάρτυρες. Τυπική απόκλιση $\pm$ SD, *, $P < 0.05$.

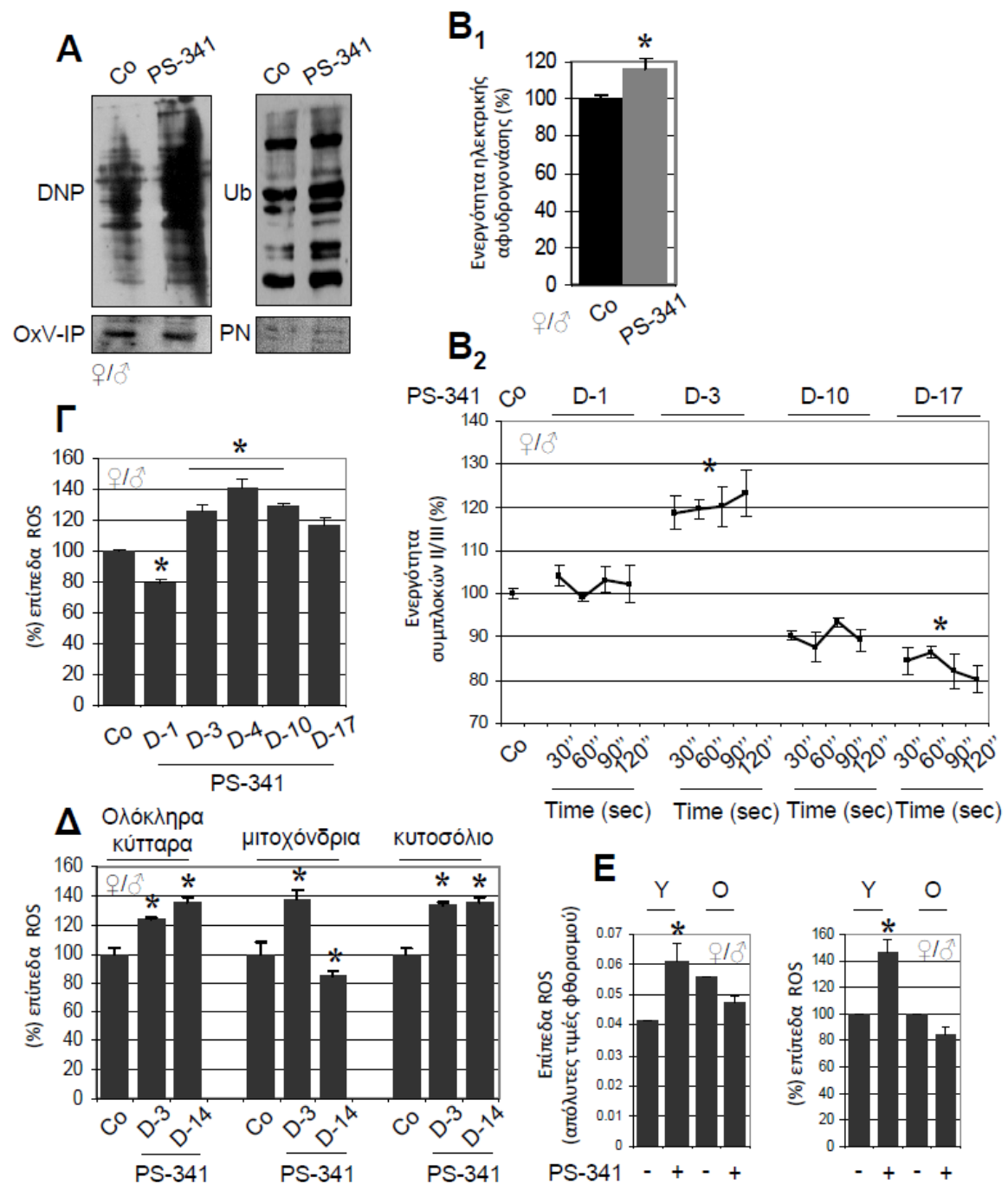
Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και σε ανθρώπινα κύτταρα όπου βρέθηκε ότι (όπως και στη *Drosophila*) η δυσλειτουργία του πρωτεασώματος επάγει την αύξηση

κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου (ROS) και την υπερέκφραση της πρωτεασωματικής υπομονάδας β5 (Εικ. 4.24).



Εικόνα 4.24 Η αναστολή του πρωτεασώματος σε ανθρώπινα κύτταρα προκάλεσε την αύξηση του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου (ROS) και την επαγωγή της β5 πρωτεασωματικής υπομονάδας. (A, B) Σχετική (%) 26S πρωτεασωματική ενεργότητα (A) και σχετικά (%) επίπεδα ROS (B) σε ανθρώπινα κύτταρα που εκτέθηκαν σε 25 nM PS-341 για 2, 4 και 8 ώρες. (Γ) Αντιπροσωπευτικό ανοσοστόψωμα έναντι της β5 πρωτεασωματικής υπομονάδας σε δείγματα από ανθρώπινα κύτταρα που εκτέθηκαν σε 25 nM PS-341 για 2, 4 και 8 ώρες. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για το πρωτεϊνικό ισοφόρτωμα. Con, δείγμα μάρτυρας. Τυπική απόκλιση $\pm$ SD, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Δεδομένου ότι η κύρια πηγή των ROS στα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι τα μιτοχόνδρια (Ferguson et al., 2005), στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της πρωτεασωματικής δυσλειτουργίας στη φυσιολογία των μιτοχονδρίων. Τα πειράματά μας σε απομονωμένα μιτοχόνδρια έδειξαν αύξηση των οξειδωμένων και ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών του μιτοχονδρίου σε νεαρά έντομα που εκτέθηκαν στον πρωτεασωμικό αναστολέα (Εικ. 4.25A). Η συσσώρευση της πρωτεωμικής βλάβης στα μιτοχόνδρια μετά από πρωτεασωματική δυσλειτουργία συσχετίστηκε με αύξηση της ενεργότητας της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (Εικ. 4.25B1) και της ενεργότητας του συμπλόκου II/III της αναπνευστικής αλυσίδας (Εικ. 4.25B2), καθώς και με σημαντική αύξηση της παραγωγής ROS (Εικ. 4.25Γ).



Εικόνα 4.25 Η πρωτεασωμική δυσλειτουργία σε σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων προκαλεί τη διαταραχή της λειτουργίας του μιτοχονδρίου και επάγει την παραγωγή των ROS από τα μιτοχόνδρια. (A) Αντιπροσωπευτικό ανοσοστύλωμα των οξειδωμένων (καρβονυλιωμένων, DNP) και των ουβικιτινωμένων (Ub) πρωτεϊνών σε απομονωμένα μιτοχόνδρια από σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων που εκτέθηκαν στον πρωτεασωμικό αναστολέα PS-341 για 12 ημέρες. Το αντίσωμα για τον επίτοπο του OXPhos complex IV και η χρώση με Ponceau χρησιμοποιήθηκαν ως έλεγχος του ισοφορτώματος. (B) Σχετική (%) ενεργότητα ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (B₁) σε απομονωμένα μιτοχόνδρια από σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων που εκτέθηκαν στον πρωτεασωμικό αναστολέα PS-341 για 13 ημέρες και σχετική (%) ενεργότητα του μιτοχονδριακού συμπλόκου II/III (B₂) σε απομονωμένα μιτοχόνδρια από σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων που εκτέθηκαν στον πρωτεασωμικό αναστολέα PS-341 για 1, 3, 10 και 17 ημέρες. (Γ, Δ) Σχετικά (%) επίπεδα ROS σε απομονωμένα μιτοχόνδρια (Γ) από σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων που

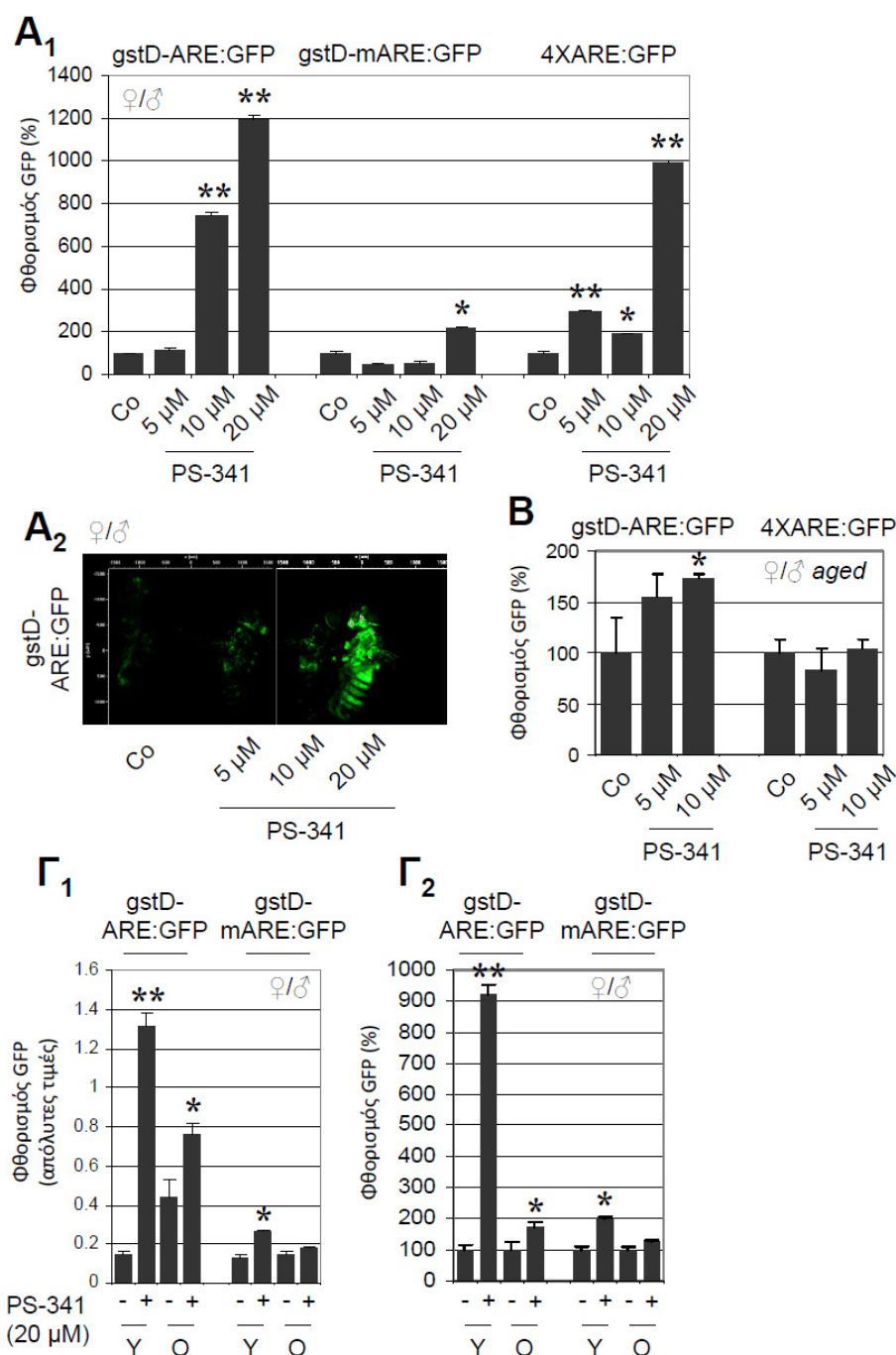
εκτέθηκαν στον πρωτεασωμικό αναστολέα PS-341 για 1-17 ημέρες και σχετικά (%) επίπεδα ROS από το κυτταρόπλασμα, τα μιτοχόνδρια (mt) και το κυτοσόλιο (cyt) από σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων που εκτέθηκαν στον πρωτεασωμικό αναστολέα PS-341 για 1-14 ημέρες (Δ). (Ε) Μονάδες φθορισμού ανά μg πρωτεΐνης και σχετικά (%) επίπεδα ROS σε απομονωμένα μιτοχόνδρια από σωματικούς ιστούς νεαρών (Y) και γηρασμένων (O) εντόμων που εκτέθηκαν στον πρωτεασωμικό αναστολέα PS-341 για 3-4 ημέρες. Σε όλα τα παραπάνω πειράματα, η συγκέντρωση του αναστολέα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1 μM. Co, δείγμα μάρτυρας. Τυπική απόκλιση ± SD, *, P<0.05.

Βρέθηκε επίσης ότι η παρατεταμένη έκθεση στον αναστολέα PS-341 προκάλεσε μείωση της ενεργότητας του μιτοχονδριακού συμπλόκου II/III [Εικ. 4.25B2, ημέρα 1 (D-1) σε σύγκριση με ημέρα 17 (D-17)], καθώς και σταδιακή μείωση της παραγωγής ROS από τα μιτοχόνδρια (Εικ. 4.25Γ,Δ)• πιθανώς λόγω γενικευμένης βλάβης και υπολειτουργίας των μιτοχονδρίων. Περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι, τα επίπεδα ROS συνεχίζουν να συσσωρεύονται στο κυτοσόλιο (Εικ. 4.25Δ), γεγονός που υποδηλώνει τη δυσλειτουργία των μηχανισμών μείωσης του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου (αντιοξειδωτικής απόκρισης) και/ή την παραγωγή ROS και από άλλες πηγές του κυττάρου (π.χ. η NADPH οξειδάση). Τέλος, πειράματα σε γηρασμένα άτομα έδειξαν ότι η μερική αναστολή της πρωτεασωμικής ενεργότητας δεν προκαλεί αύξηση της παραγωγής ROS στα μιτοχόνδρια του σωματικού ιστού (Εικ. 4.25Ε). Επομένως, η δυσλειτουργία του πρωτεασώματος στο σωματικό ιστό νεαρών εντόμων προκαλεί τη διαταραχή της μιτόστασης, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση ROS, τα οποία σηματοδοτούν την πρωτεασωμική δυσλειτουργία.

4.11 Η δυσλειτουργία του πρωτεασώματος προκαλεί επαγωγή της έκφρασης των πρωτεασωμικών γονιδίων μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2/CncC

Δεδομένου, ότι η πρωτεασωμική δυσλειτουργία προκαλεί αύξηση του κυτταρικού οξειδωτικού στρες, στη συνέχεια, μελετήθηκε αν ο κύριος μεταγραφικός παράγοντας ενεργοποίησης της αντιοξειδωτικής απόκρισης του κυττάρου, Nrf2/CncC, εμπλέκεται στη σηματοδότηση της πρωτεασωμικής δυσλειτουργίας. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν τα διαγονιδιακά έντομα που φέρουν το γονίδιο της πρωτεΐνης GFP υπό τον έλεγχο ενός υποκινητή που φέρει λειτουργικό στοιχείο αντιοξειδωτικής απόκρισης ARE (του υποκινητή του γονιδίου *gstDI*). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά έντομα που φέρουν τέσσερα συνθετικά λειτουργικά AREs, ή ένα μεταλλαγμένο ARE (έντομα μάρτυρες) (Sykiotis και Bohmann, 2008). Τα πειράματά μας έδειξαν ότι η αναστολή της ενεργότητας του πρωτεασώματος προκαλεί ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής απόκρισης του κυττάρου, καθώς παρατηρήθηκε (προφανώς λόγω ενεργοποίησης των AREs) αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης GFP στους σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων, που εκτέθηκαν στον αναστολέα

(Εικ. 4.26Α). Το παραπάνω εύρημα αφορά μόνο σε νεαρά έντομα, καθώς όταν εκτέθηκαν γηρασμένα έντομα στον PS-341 η ενεργοποίηση των AREs ήταν σημαντικά μικρότερη σε σχέση με αυτή που παρατηρήθηκε στους νεαρούς σωματικούς ιστούς (Εικ. 4.26Β, Γ).

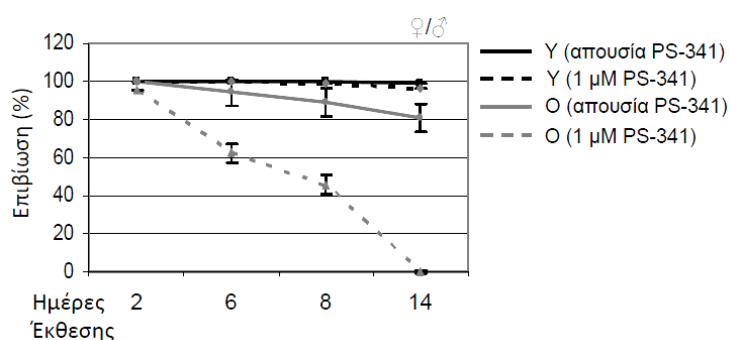


Εικόνα 4.26 Η πρωτεασωματική δυσλειτουργία επάγει την ενεργοποίηση των στοιχείων αντιοξειδωτικής απόκρισης (AREs) σε σωματικούς ιστούς από νεαρά έντομα *Drosophila*. (A1) Σχετικός (%) φθορισμός της πρωτεΐνης GFP μετά από αναστολή της πρωτεασωματικής ενεργότητας σε σωματικούς ιστούς από νεαρά διαγονιδιακά έντομα, gstD-ARE:GFP, gstD-mARE:GFP και 4XARE:GFP. (A2) Άμεση παρατήρηση του φθορισμού της πρωτεΐνης GFP σε διαγονιδιακά έντομα gstD-ARE:GFP που εκτέθηκαν στον αναστολέα με συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης (Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM). (B) Σχετικός (%) GFP φθορισμός σε σωματικούς ιστούς από γηρασμένα (aged) διαγονιδιακά έντομα gstD-ARE:GFP και 4XARE:GFP που εκτέθηκαν στον αναστολέα. (Γ) Μονάδες

φθορισμού GFP ανά μg πρωτεΐνης (Γ1) ή σχετικά (%) επίπεδα φθορισμού GFP (Γ2) μετά από αναστολή του πρωτεασώματος σε νεαρά (Y) ή γηρασμένα (O) διαγονιδιακά έντομα *gstD-ARE:GFP* ή *gstD-mARE:GFP*. Σε όλες τις περιπτώσεις τα έντομα εκτέθηκαν στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις του πρωτεασωμικού αναστολέα για 4 ημέρες. Co, δείγμα μάρτυρας. Τυπική απόκλιση $\pm$ SD, *, $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στην Εικ. 4.26Γ, παρόλο που τα ενδογενή επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης GFP στο γηρασμένο σωματικό ιστό ήταν υψηλότερα κατά περίπου δύο φορές σε σύγκριση με το σωματικό ιστό από νεαρά έντομα, η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης GFP στα γηρασμένα έντομα, μετά από έκθεση στον πρωτεασωμικό αναστολέα δεν έφτασε τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης GFP των νεαρών εντόμων, που εκτέθηκαν στην ίδια συγκέντρωση του αναστολέα (Εικ. 4.26Γ).

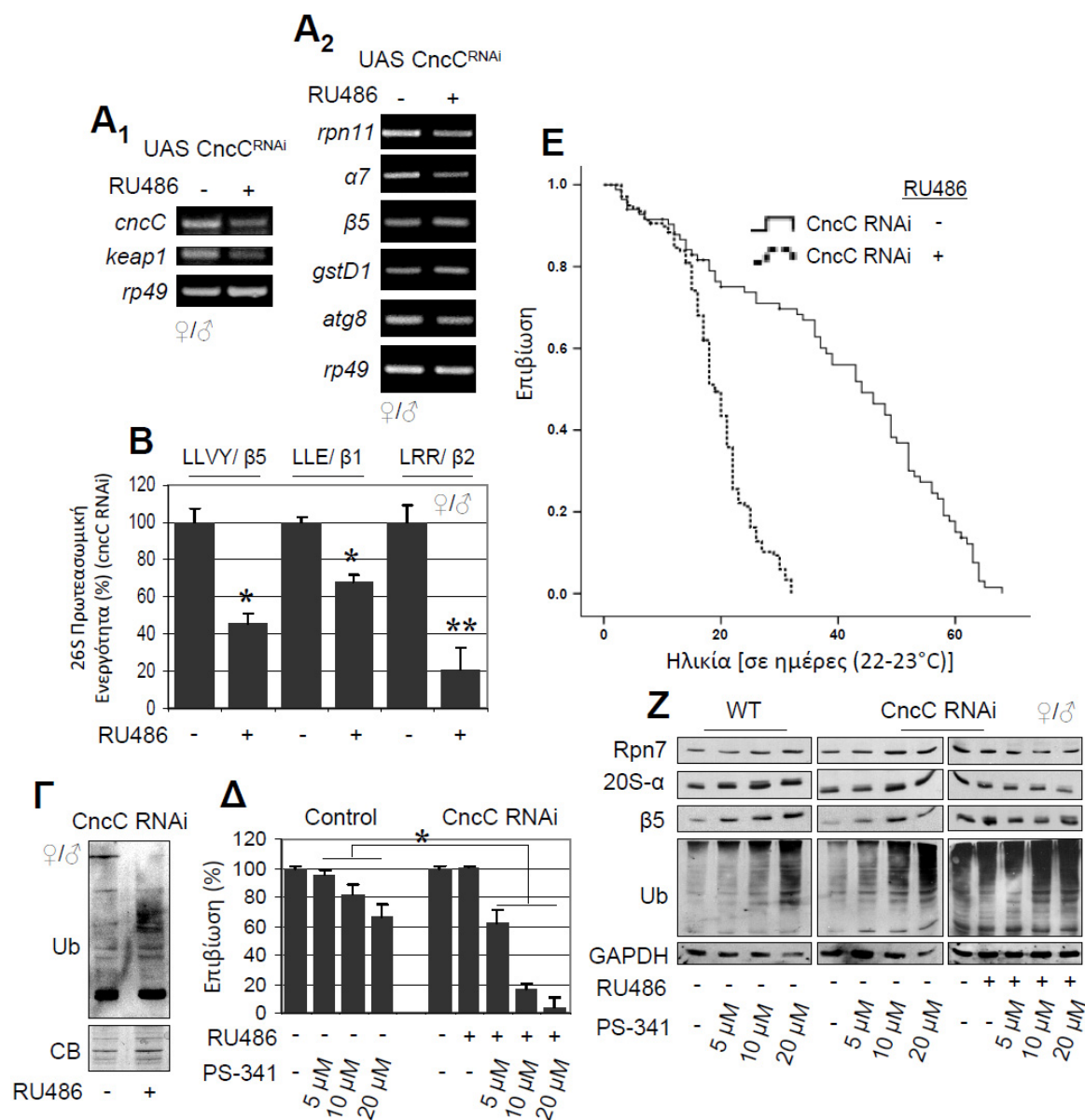
Τα παραπάνω ευρήματα δεικνύουν πως οι μηχανισμοί απόκρισης στο στρες υπολειτουργούν σημαντικά στους σωματικούς ιστούς. Προκειμένου να ελεγχθεί περαιτέρω αυτό το εύρημα, γηρασμένα άτομα εκτέθηκαν σε σχετικά μικρές συγκεντρώσεις του PS-341. Όπως φαίνεται στην Εικ. 4.27, τα γηρασμένα άτομα εμφανίζουν σημαντική ευαισθησία στην, έστω και ήπια, πρωτεασωμική δυσλειτουργία.



Εικόνα 4.27. Η επίδραση του πρωτεασωμικού αναστολέα PS-341 στη μακροβιότητα νεαρών και γηρασμένων εντόμων. Τα γηρασμένα (O) άτομα εμφάνισαν ραγδαία μείωση του προσδόκιμου ζωής σε σύγκριση με τα νεαρά (Y) άτομα όταν εκτέθηκαν σε συγκέντρωση του αναστολέα PS-341 1 μM .

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο κύριος μεταγραφικός παράγοντας για την ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής απόκρισης του κυττάρου είναι ο Nrf2/CncC (Sykiotis και Bohmann, 2010), ο οποίος προσδένεται στα στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης (AREs) και ενεργοποιεί την έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Έτσι, στη συνέχεια, μελετήθηκε η συμμετοχή του CncC στην επαγωγή της έκφρασης των πρωτεασωμικών γονιδίων μετά από πρωτεασωμική δυσλειτουργία. Για τις μελέτες αυτές χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά έντομα στα οποία είτε είχε (μέσω RNAi) κατασταλεί η έκφραση του CncC [στελέχη (II)UAS-CncCRNAi/tubGS10Gal4;(III)WizC/+] είτε είχε κατασταλεί η έκφραση της πρωτεΐνης Keap1 [στελέχη (II)UAS-Keap1 RNAi/+;(III)UAS-Keap1 RNAi/tubGS5Gal4]. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη που υπερέκφραζαν τον μεταγραφικό παράγοντα CncC [στελέχη (II)UASCncC/+;(III)tubGS5Gal4/+ και (III)UASCncC/tubGS5Gal4]. Να τονιστεί

ότι στα παραπάνω διαγονιδιακά έντομα, το διαγονίδιο ενεργοποιείται με επαγόμενο τρόπο και συγκεκριμένα με τη χορήγηση της ορμόνης RU486.



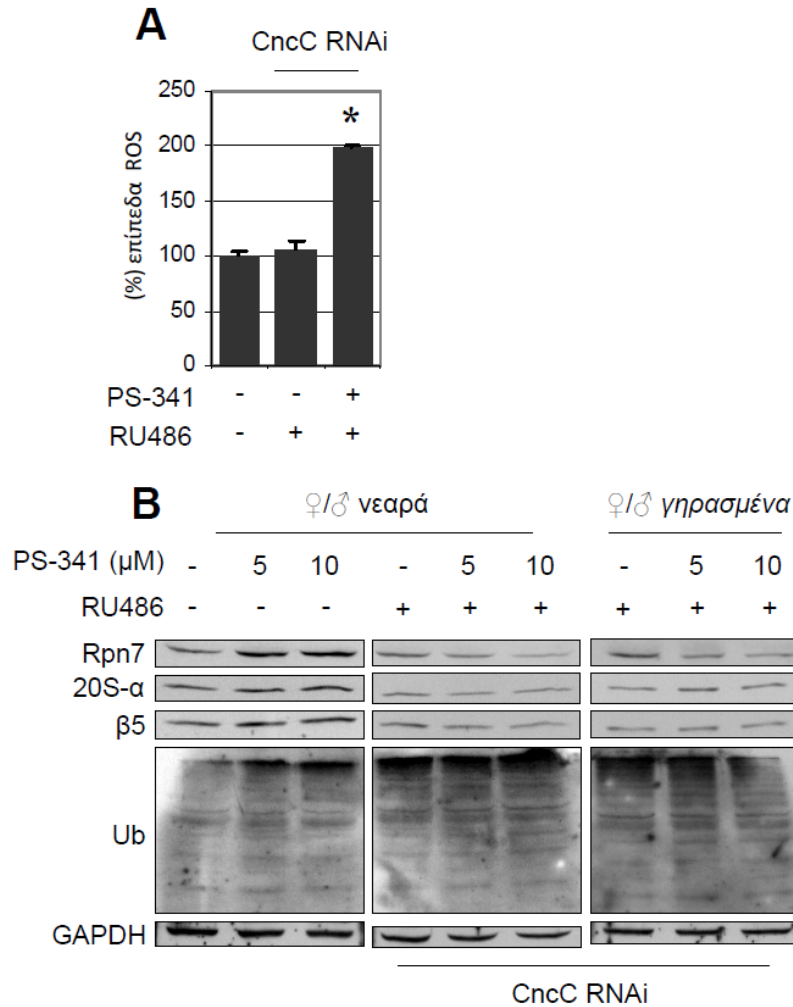
Εικόνα 4.28 Η καταστολή της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2/CncC οδηγεί σε μείωση της πρωτεασωμικής ενεργότητας, διαταραχή της πρωτεόστασης, αυξημένη ευαισθησία παρουσία πρωτεοτοξικού στρες, μείωση του προσδόκιμου ζωής και τέλος, σε κατάργηση της επαγωγής της έκφρασης του πρωτεασώματος μετά από πρωτεασωμική δυσλειτουργία. (Α) Αντιπροσωπευτική ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων *cncC* και *keap1* (A₁), των πρωτεασωμικών υπομονάδων *rpn11*, *α7*, *β5* και των γονιδίων *gstD1* και *atg8*, (A₂) σε σωματικούς ιστούς των διαγονιδιακών εντόμων. Το γονίδιο *rp49* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς και η επαγωγή του διαγονιδίου πραγματοποιήθηκε με χορήγηση της ορμόνης RU486 για 4 ημέρες. (Β) Σχετική (%) 26S πρωτεασωμική ενεργότητα σε σωματικούς ιστούς των διαγονιδιακών εντόμων. (Γ) Αντιπροσωπευτικό ανοσοστύπωμα των ουβικιτινωμένων (Ub) πρωτεϊνών σε σωματικούς ιστούς διαγονιδιακών εντόμων, όπου η ορμόνη RU486 χορηγήθηκε για 14 ημέρες. Η χρώση Coomassie Blue (CB) χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του ισοφορτώματος. (Δ) Διάγραμμα βιωσιμότητας (%) των διαγονιδιακών εντόμων που εκτέθηκαν στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις του αναστολέα PS-341 για 6 ημέρες• η ορμόνη RU486 χορηγήθηκε καθ' όλη

τη διάρκεια του πειράματος. (Ε) Καμπύλες βιωσιμότητας των διαγονιδιακών εντόμων που εκτέθηκαν στην ορμόνη RU486 για όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Στα έντομα μάρτυρες χορηγήθηκε ο διαλύτης της ορμόνης (80% αιθανόλη). Οι μέσοι όροι και οι στατιστικές αναλύσεις των καμπυλών βιωσιμότητας αναφέρονται στον Πίνακα 2 του παραρτήματος Ι. (Ζ) Αντιπροσωπευτικό ανοσοστίγωμα έναντι των πρωτεασωμικών υπομονάδων Rpn7, 20S-α, β5 και της ουβικιτίνης (Ub) από σωματικούς ιστούς νεαρών διαγονιδιακών εντόμων που εκτέθηκαν στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις του αναστολέα για 4 ημέρες. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για τον έλεγχο του ισοφορτώματος. Τυπική απόκλιση, $\pm$ SD, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Αρχικά παρατηρήθηκε ότι η καταστολή της έκφρασης του CncC (Εικ. 4.28Α1) είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των τριών ενζυμικών ενεργοτήτων του πρωτεασώματος στους σωματικούς ιστούς από νεαρά έντομα (Εικ. 4.28Β). Επίσης, παρατηρήθηκε συσσώρευση των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών (Εικ. 4.28Γ), αύξηση ευαισθησίας παρουσία πρωτεοτοξικού στρες (Εικ. 4.28Δ), καθώς και σημαντική μείωση του προσδόκιμου ζωής των εντόμων (Εικ. 4.28Ε). Επιπλέον, η καταστολή της σηματοδότησης του CncC φάνηκε να επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης mRNA των γονιδίων *rpn11* και *a7* (Εικ. 4.28Α2). Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει, ότι πιθανώς, ο CncC εμπλέκεται στη ρύθμιση των ενδογενών επιπέδων έκφρασης των πρωτεασωμικών γονιδίων στους σωματικούς ιστούς της *Drosophila*.

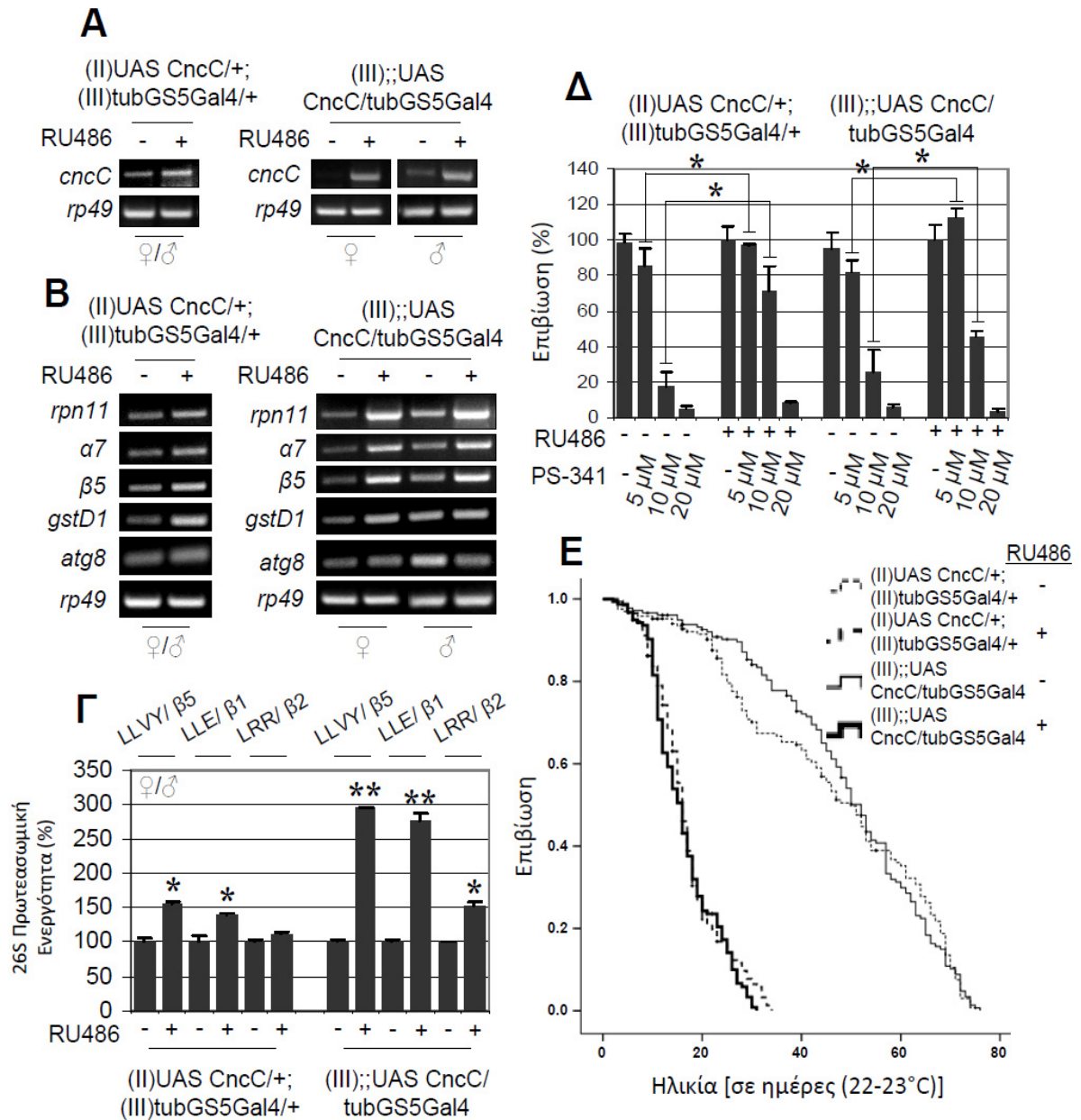
Ακόμη, όταν νεαρά και γηρασμένα διαγονιδιακά έντομα, με κατασταλμένη την έκφραση του CncC, εκτέθηκαν στον πρωτεασωμικό αναστολέα δεν παρατηρήθηκε επαγωγή της έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων (Εικ. 4.28Ζ και Εικ. 4.29Β) αν και παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου (ROS) (Εικ. 4.29Α).

Το παραπάνω εύρημα δεικνύει ότι ο μεταγραφικός παράγοντας CncC διαμεσολαβεί στην επαγωγή της υπερέκφρασης των πρωτεασωμικών γονιδίων μετά από πρωτεοτοξικό στρες στους σωματικούς ιστούς των νεαρών εντόμων. Συμπληρωματικά πειράματα με τη χρήση των δυο διαγονιδιακών στελεχών που υπερεκφράζουν τον CncC [(II) UASCncC/+; (III) tubGS5Gal4/+ και (III) UASCncC/tubGS5Gal4] (Εικ. 4.30Α) έδειξαν ότι η επαγόμενη υπερέκφραση του CncC προκαλεί αύξηση της γονιδιακής έκφρασης των ενδογενών επιπέδων των πρωτεασωμικών γονιδίων, καθώς και του γονιδίου αντιοξειδωτικής απόκρισης *gstD1* (αλλά όχι του γονιδίου αυτοφαγίας *atg8*) (Εικ. 4.30Β). Η αύξηση της έκφρασης των πρωτεασωμικών γονιδίων συσχετίστηκε με την αύξηση της 26S πρωτεασωμικής ενεργότητας (Εικ. 4.30Γ) και είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη ανθεκτικότητα των εντόμων σε παροδικό πρωτεοτοξικό στρες (Εικ. 4.30Δ).



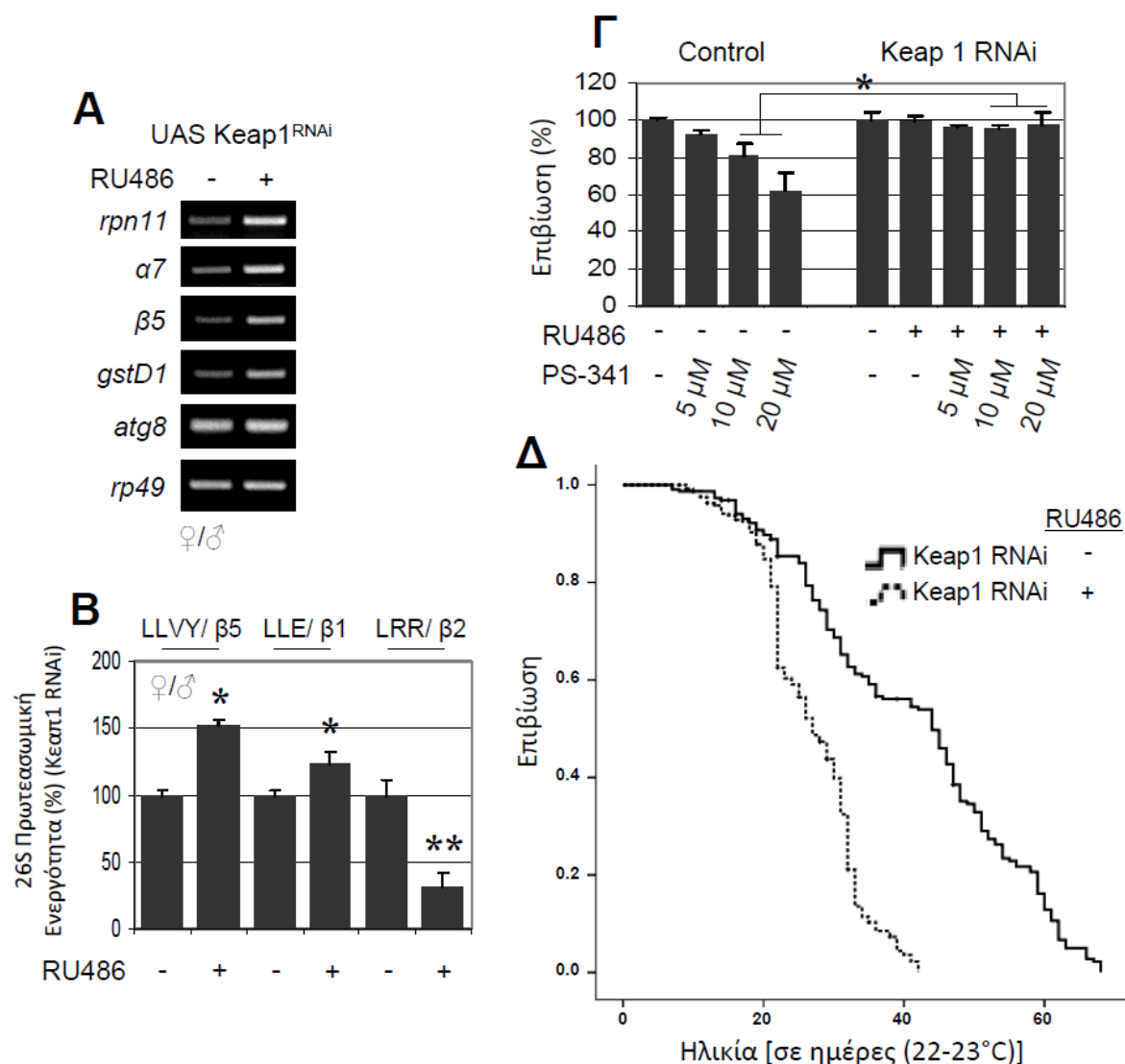
Εικόνα 4.29 Η αναστολή της πρωτεασωματικής δυσλειτουργίας σε διαγονιδιακά έντομα που έχουν κατασταλασμένη την έκφραση του CncC αν και σχετίζεται με αύξηση του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου (ROS) δεν προκαλεί επαγωγή της έκφρασης των πρωτεασωματικών υπομονάδων. (A) Σχετικά (%) επίπεδα ROS στους σωματικούς ιστούς από νεαρά διαγονιδιακά έντομα παρουσία ή απουσία του αναστολέα PS-341 σε συγκέντρωση 1 μM για 3-4 ημέρες. (B) Αντιπροσωπευτικό ανοσοστύπωμα έναντι των πρωτεασωματικών υπομονάδων Rpn7, 20S-α, β5 και της ουβικιτίνης (Ub) από σωματικούς ιστούς νεαρών και γηρασμένων διαγονιδιακών εντόμων που εκτέθηκαν στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις του αναστολέα για 4 ημέρες. Τυπική απόκλιση, $\pm$ SD, *, $P < 0.05$.

Παρόλα αυτά, η συνεχής υπερέκφραση του CncC μείωσε σημαντικά το προσδόκιμο ζωής των εντόμων (Εικ. 4.30E), υποδηλώνοντας ότι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των συστημάτων που ελέγχουν την πρωτεόσταση είναι ωφέλιμα για μικρό χρονικό διάστημα, αλλά η παρατεταμένη ενεργοποίησή τους είναι τελικά τοξική για τον οργανισμό.



Εικόνα 4.30 Η υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2/CncC προκαλεί αύξηση των ενδογενών επιπέδων έκφρασης του πρωτεασώματος, αύξηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας και της ανθεκτικότητας παρουσία πρωτεοτοξικού στρες, αλλά τελικά μειώνει το προσδόκιμο ζωής. (A, B) Αντιπροσωπευτική ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου *cncC* (A) και των πρωτεασωμικών υπομονάδων *rpn11*, *α7*, *β5*, καθώς και των γονιδίων *gstD1* και *atg8*, (B) σε σωματικούς ιστούς δύο στελεχών διαγονιδιακών εντόμων που υπερεκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα CncC σε διαφορετική ένταση. Το γονίδιο *rp49* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς και η επαγωγή του διαγονιδίου πραγματοποιήθηκε με χορήγηση της ορμόνης RU486 για 4 ημέρες. (Γ) Σχετική (%) 26S πρωτεασωμική ενεργότητα σε σωματικούς ιστούς των διαγονιδιακών εντόμων. (Δ) Διάγραμμα βιωσιμότητας (%) των διαγονιδιακών εντόμων που εκτέθηκαν στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις του αναστολέα PS-341 για 6 ημέρες (η ορμόνη RU486 χορηγήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος). (Ε) Καμπύλες βιωσιμότητας των διαγονιδιακών εντόμων που εκτέθηκαν στην ορμόνη RU486 για όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Στα έντομα μάρτυρες χορηγήθηκε ο διαλύτης της ορμόνης (80% αιθανόλη). Οι μέσοι όροι και οι στατιστικές αναλύσεις των καμπυλών βιωσιμότητας αναφέρονται στον Πίνακα 2 του παραρτήματος Ι. Τυπική απόκλιση ± SD, *, P<0.05, **, P<0.01.

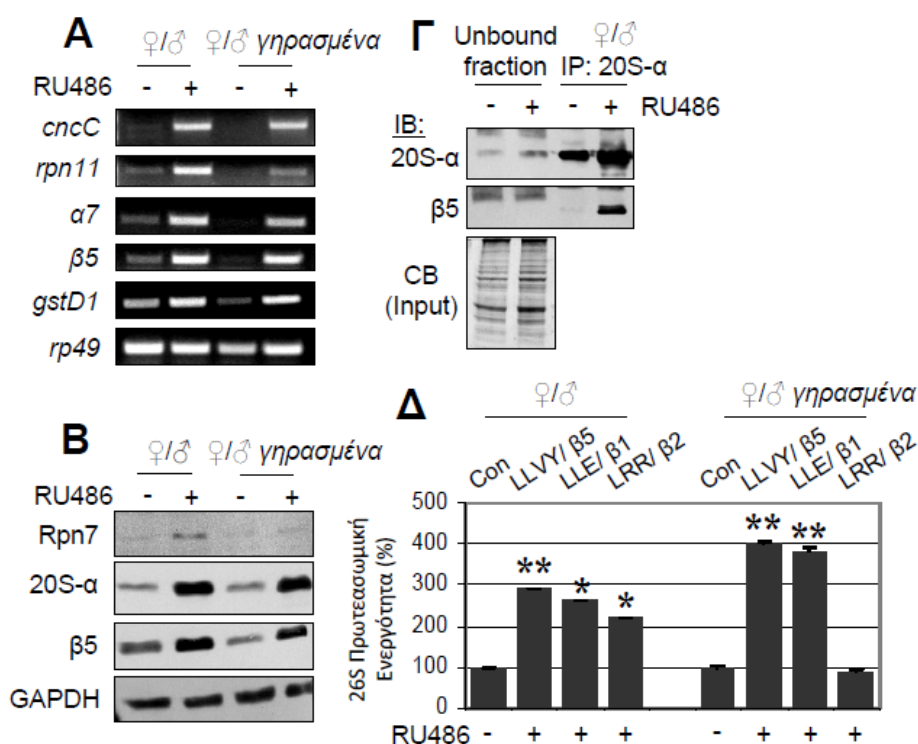
Στη συνέχεια, η σχέση του CncC και της λειτουργικότητας του πρωτεασώματος με τη μακροβιότητα διερευνήθηκε σε διαγονιδιακά έντομα που είχαν ενεργοποιημένο το ενδογενές μονοπάτι του CncC μέσω της RNAi-επαγόμενης καταστολής του CncC αναστολέα Keap1 (Εικ. 4.31).



Εικόνα 4.31 Η καταστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης Keap1 (αναστολέας του CncC) προκαλεί αύξηση της γονιδιακής έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων, της 26S πρωτεασωμικής ενεργότητας και προσφέρει ανθεκτικότητα σε πρωτεοτοξικό στρες• τελικά όμως, επέφερε μείωση του προσδόκιμου ζωής των εντόμων. (A) Αντιπροσωπευτική ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων των πρωτεασωμικών υπομονάδων *rpn11*, *α7*, *β5* και των γονιδίων *gstD1* και *atg8* σε σωματικούς ιστούς των διαγονιδιακών εντόμων που είχαν κατασταλμένη την έκφραση της πρωτεΐνης Keap1. Το γονίδιο *rp49* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς και η επαγωγή του διαγονιδίου πραγματοποιήθηκε με χορήγηση της ορμόνης RU486 για 4 ημέρες. (B) Σχετική (%) 26S πρωτεασωμική ενεργότητα σε σωματικούς ιστούς των διαγονιδιακών εντόμων. (Γ) Διάγραμμα βιωσιμότητας (%) των διαγονιδιακών εντόμων που εκτέθηκαν στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις του αναστολέα PS-341 για 6 ημέρες (η ορμόνη RU486 χορηγήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος). (Δ) Καμπύλες βιωσιμότητας των διαγονιδιακών εντόμων που εκτέθηκαν στην ορμόνη RU486 για όλη τη διάρκεια της ζωής τους• στα έντομα μάρτυρες χορηγήθηκε ο διαλύτης της ορμόνης (80% αιθανόλη). Οι μέσοι

όροι και οι στατιστικές αναλύσεις των καμπυλών βιωσιμότητας αναφέρονται στον Πίνακα 2 του παραρτήματος I. Co, δείγμα μάρτυρας. Τυπική απόκλιση, $\pm$ SD, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Βρέθηκε ότι η μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης Keap1 αύξησε την έκφραση των πρωτεασωμικών γονιδίων, καθώς και του γονιδίου *gstD1* στους σωματικούς ιστούς των νεαρών ατόμων (Εικ. 4.31Α). Επίσης, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της 26S πρωτεασωμικής ενεργότητας (Εικ. 4.31Β) καθώς και την αυξημένη ανθεκτικότητα των διαγονιδιακών εντόμων στον αναστολέα PS-341 (Εικ. 4.31Γ). Παρόλα αυτά (όπως και στη περίπτωση της μέσω διαγονιδίου-επαγόμενης υπερέκφρασης του CncC) η καταστολή της πρωτεΐνης Keap1 είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του προσδόκιμου ζωής των εντόμων (Εικ. 4.31Δ).



Εικόνα 4.32 Η ενεργοποίηση του Nrf2/CncC μπορεί να επάγει την αύξηση της έκφρασης του πρωτεασώματος στους σωματικούς ιστούς των εντόμων ανεξαρτήτως ηλικίας. (Α, Β) Αντιπροσωπευτική ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων των πρωτεασωμικών υπομονάδων *rpn11*, *α7*, *β5* και των γονιδίων *gstD1* και *cncC* (Α) και αντιπροσωπευτικό ανοσοσύτρωμα έναντι των υπομονάδων Rpn7, 20S-α και β5 (Β) σε σωματικούς ιστούς νεαρών (♂,♀) και γηρασμένων (♂,♀aged) διαγονιδιακών εντόμων που υπερεκφράζαν το μεταγραφικό παράγοντα CncC. Το γονίδιο *rp49* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς και η πρωτεΐνη GAPDH για τον έλεγχο του ισοφορτώματος. (Γ) Ανοσοκατακρήμνιση (IP) του 20S πρωτεασώματος με αντίσωμα έναντι των α υπομονάδων (20S-α) και ανοσοεντόπιση (WB) με αντίσωμα έναντι των α υπομονάδων και της β5 υπομονάδας (που υποδηλώνει την ύπαρξη αυτοσυγκροτημένου πρωτεασώματος), σε κυτταρικό λύμα από σωματικούς ιστούς νεαρών διαγονιδιακών εντόμων. Η χρώση Coomassie Blue (CB) χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του ισοφορτώματος. (Δ) Σχετική (%) 26S πρωτεασωμική ενεργότητα σε σωματικούς ιστούς νεαρών (♂,♀) και γηρασμένων (♂,♀aged) διαγονιδιακών εντόμων. Η επαγωγή του διαγονιδίου σε όλες τις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε με χορήγηση της ορμόνης RU486 για 4 ημέρες. Con, δείγμα μάρτυρας. Τυπική απόκλιση $\pm$ SD, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Δεδομένης της αδυναμίας απόκρισης του γηρασμένου σωματικού ιστού στο πρωτεοτοξικό στρες, στη συνέχεια μελετήθηκε (έμμεσα) η δυνατότητα πρόσβασης του μεταγραφικού παράγοντα CncC στα ρυθμιστικά στοιχεία των πρωτεασωμικών γονιδίων στον γηρασμένο ιστό. Με άλλα λόγια, μελετήθηκαν οι ηλικιο-εξαρτώμενες μεταβολές στη χρωματίνη που ενδεχομένως έχουν ως αποτέλεσμα τη μη επιτυχή ενεργοποίηση της έκφρασης των πρωτεασωμικών γονιδίων από τον CncC κατά τη γήρανση. Προκειμένου να απαντηθεί αυτό το ερώτημα, ενεργοποιήθηκε η υπερέκφραση του CncC (μέσω του επαγόμενου συστήματος) σε νεαρά και γηρασμένα έντομα. Στα πειράματα αυτά, μελετήθηκαν συγκριτικά οι σωματικοί ιστοί και βρέθηκε ότι η υπερέκφραση του CncC επάγει την υπερέκφραση των πρωτεασωμικών γονιδίων και πρωτεϊνικών υπομονάδων (Εικ. 4.32Α, 4.32Β), και προκαλεί αύξηση των αυτοσυγκροτημένων πρωτεασώματων (Εικ. 4.32Γ), καθώς και των ενζυμικών ενεργότητων του 26S πρωτεασώματος (Εικ. 4.32Δ) τόσο στα νεαρά όσο και στα γηρασμένα έντομα.

Συμπερασματικά, η δυσλειτουργία του πρωτεασώματος στη *Drosophila* προκαλεί κυτταρικές αποκρίσεις που διαμεσολαβούνται από τον μεταγραφικό παράγοντα CncC. Επίσης, η αδυναμία επαγωγής της αντιοξειδωτικής απόκρισης στο γηρασμένο σωματικό ιστό δε σχετίζεται με ηλικιο-εξαρτώμενες τροποποιήσεις στη χρωματίνη. Φαίνεται επίσης ότι, από τη φάση ενεργοποίησης των πρωτεασωμικών γονιδίων μέχρι την τελική αύξηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας δεν μεσολαβούν περαιτέρω ρυθμιστικά στάδια.

4.12 Χαρτογράφηση των επιπτώσεων της RNAi-επαγόμενης καταστολής της *in vivo* καταστολής της έκφρασης (μέσω RNAi) των πρωτεασωμικών υπομονάδων στη φυσιολογία του οργανισμού

Όπως αναφέρθηκε ήδη, η μερική καταστολή της λειτουργίας του πρωτεασώματος (είτε με φαρμακολογικό τρόπο είτε με RNAi-επαγόμενη μείωση της έκφρασης των α7 ή β5 υπομονάδων) προκαλεί θνησιμότητα σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια (βλέπε παραπάνω). Στα πλαίσια περαιτέρω πειραμάτων, μελετήθηκε εκτενέστερα η επίδραση της ειδικής RNAi-επαγόμενης καταστολής υπομονάδων του 20S και 19S πρωτεασώματος στη φυσιολογία του οργανισμού και την κυτταρική ομοιοστασία. Σκοπός της παρούσας ενότητας της Διατριβής είναι να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα του φαρμακολογικού μοντέλου (PS-341) με γενετικό τρόπο και επίσης, να χαρτογραφηθεί η “σημαντικότητα” των διάφορων πρωτεασωμικών υπομονάδων στην *in vivo* αυτοσυγκρότηση και, τελικά, τη λειτουργία του πρωτεασώματος.

Η επαγόμενη (με χρήση της ορμόνης RU486) μείωση της έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων του 26S και 20S πρωτεασώματος επιτεύχθηκε όπως ήδη αναφέρθηκε, μέσω RNAi. Αρχικά, βρέθηκε ότι η μείωση της έκφρασης των υπομονάδων, Rpn11 και Rpn6 (καθώς και η καταστολή της β5 και α7 υπομονάδας που είχε ήδη μελετηθεί) προκάλεσε θνησιμότητα στο στάδιο της λάρβας–προνύμφης (Πίνακας 4.1).

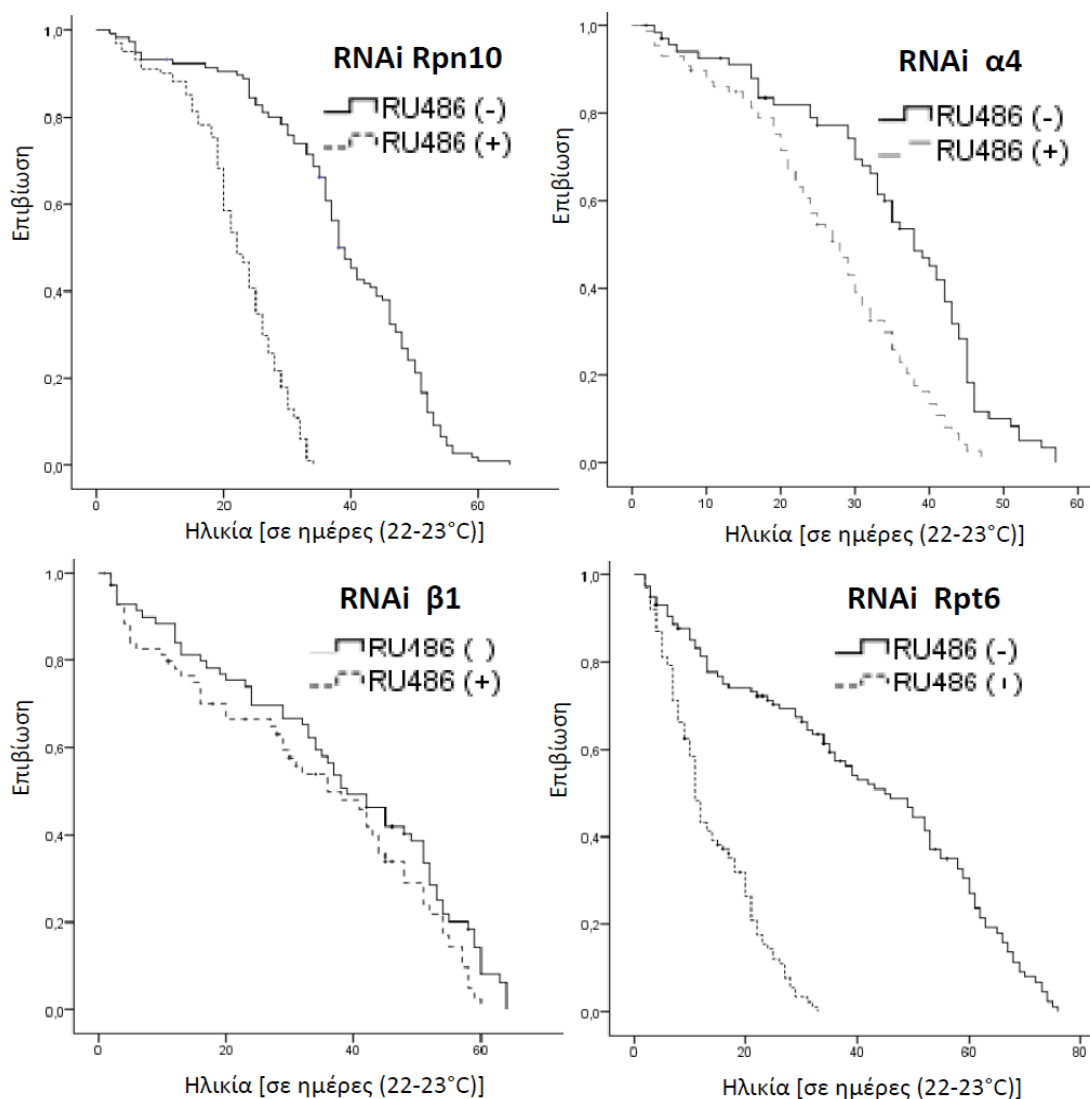
Να υπογραμμιστεί ότι ο παραπάνω φαινότυπος παρατηρήθηκε χωρίς την προσθήκη της ορμόνης RU486, επομένως φαίνεται πως ακόμη και απουσία της ορμόνης RU486 υπάρχει μια ήπια διαρροή της έκφρασης του διαγονιδίου (όπως παρατηρήθηκε και στην περίπτωση καταστολής της β5 και α7 υπομονάδας).

RNAi πρωτεασωμικής υπομονάδας	Φαινότυπος
Rpn11	Θνησιμότητα στο 2 ^ο στάδιο λάρβας
Rpn10	<i>Μειωμένο προσδόκιμο ζωής</i>
Rpn6	Θνησιμότητα στο 3 ^ο στάδιο λάρβας ή στο στάδιο pronύμφης
Rpt6	<i>Μειωμένο προσδόκιμο ζωής</i>
α4	<i>Μειωμένο προσδόκιμο ζωής</i>
α7	Θνησιμότητα στο 2 ^ο στάδιο λάρβας
β1	<i>Μειωμένο προσδόκιμο ζωής</i>
β5	Θνησιμότητα στο 2 ^ο στάδιο λάρβας

Πίνακας 4.1. Συνολικά αποτελέσματα των φαινοτυπικών ευρημάτων μετά από RNAi-επαγόμενη καταστολή της έκφρασης των υπομονάδων του 20S και 19S πρωτεασώματος.

Βρέθηκε επίσης ότι η μείωση της έκφρασης των υπομονάδων β1, α4, α7, Rpn10 και Rpt6 είχε ως αποτέλεσμα την εκκόλαψη ενήλικων εντόμων (Πίνακας 4.1). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν μελέτες μακροβιότητας μετά από έκθεση των εντόμων στην ορμόνη RU486, προκειμένου να προκληθεί πλήρης ενεργοποίηση της έκφρασης του RNAi διαγονιδίου).

Όπως φαίνεται στην Εικ. 4.33, διαπιστώθηκε μειωμένο προσδόκιμο ζωής σε όλες τις περιπτώσεις. Η εντονότερη μείωση παρατηρήθηκε μετά από καταστολή της έκφρασης της Rpt6 υπομονάδας (Εικ 4.33).

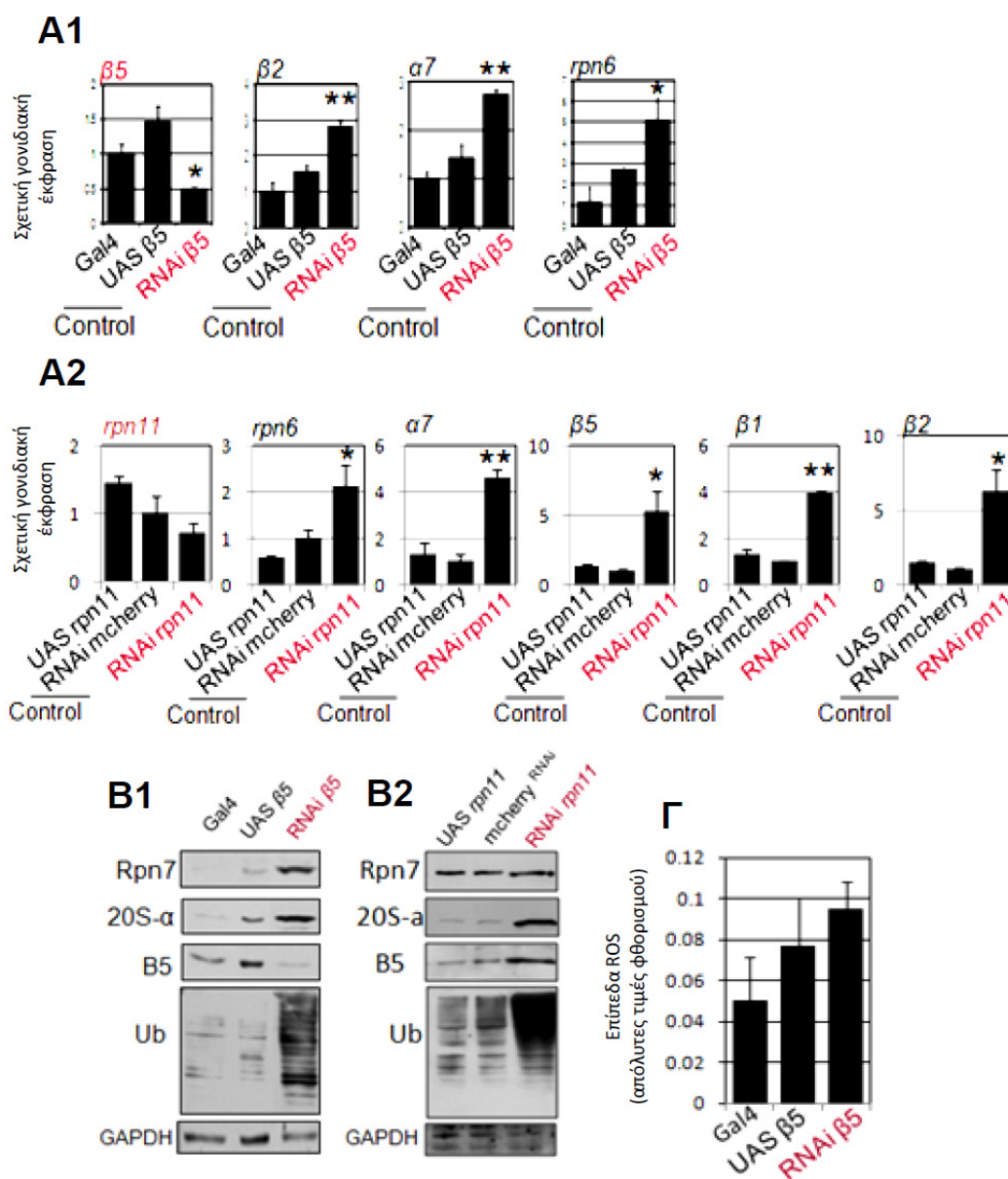


Εικόνα. 4.33 Διαγονιδιακά έντομα με κατασταλμένη την έκφραση των πρωτεασωμικών υπομονάδων β1, α4, Rpn10 και Rpt6 εμφάνισαν μείωση του προσδόκιμου ζωής. Αντιπροσωπευτικές καμπύλες μακροβιότητας των διαγονιδιακών εντόμων απουσία [RU486 (-)] ή παρουσία [RU486 (+)] της ορμόνης RU486. Οι μέσοι όροι και οι στατιστικές αναλύσεις των καμπυλών μακροβιότητας αναφέρονται στον Πίνακα 3 του παραρτήματος I.

Συμπερασματικά, η καταστολή της έκφρασης των υπομονάδων του 20S και 19S πρωτεασώματος έχει διαφορετική βαρύτητα στην πρωτεασωμική λειτουργία και τη φυσιολογία της *Drosophila*. Επίσης, τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα των δοκιμών μακροβιότητας μετά από έκθεση των εντόμων στον πρωτεασωμικό αναστολέα PS-341.

4.13 Η RNAi-επαγόμενη μείωση της έκφρασης των υπομονάδων του 20S και 19S πρωτεασώματος προκαλεί αύξηση της γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης του πρωτεασώματος και αύξηση του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου

Στη συνέχεια, μελετήθηκαν οι μοριακές-κυτταρικές επιπτώσεις που προκαλούνται ως αποτέλεσμα της RNAi-επαγόμενη μείωσης της έκφρασης των υπομονάδων του 20S και 19S πρωτεασώματος. Τα πειράματά μας έδειξαν ότι η καταστολή της έκφρασης της $\beta 5$ καταλυτικής ή της Rpn11 ρυθμιστικής υπομονάδας του πρωτεασώματος προκαλούν την επαγωγή της γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης των υπόλοιπων πρωτεασωμικών υπομονάδων. Επίσης, προκλήθηκε ήπια αύξηση του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου (ROS) (Εικ. 4.34).



Εικ. 4.34 Η καταστολή της έκφρασης των υπομονάδων $\beta 5$ και Rpn11 του πρωτεασώματος εμφανίζει αύξηση της γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης του υπολοίπων πρωτεασωμικών υπομονάδων και αύξηση του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου (ROS). (Α) Σχετικά επίπεδα γονιδιακής έκφρασης (με τη χρήση Q-RT-PCR) των γονιδίων *rpn11*, *rpn6*, *$\alpha 7$* , *$\beta 5$* , *$\beta 2$* και *$\beta 1$* σε ολόκληρα σώματα λαρβών 2^{ου}-3^{ου} σταδίου που είχαν κατασταλασμένη την έκφραση της $\beta 5$ υπομονάδας (A1) ή της ρυθμιστικής Rpn11

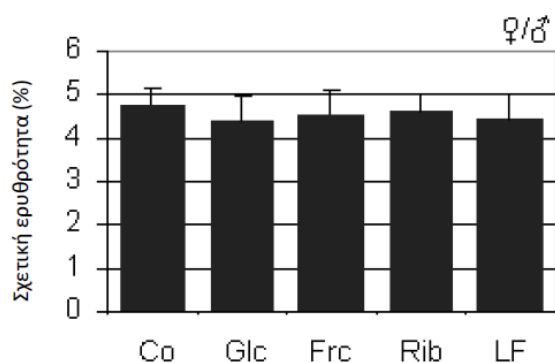
υπομονάδας (A2). (B) Αντιπροσωπευτικό ανοσοστόπωμα έναντι των πρωτεϊνών Rpn7, 20S-α, β5 και ουβικιτίνης (Ub) σε ολόκληρα σώματα λαρβών 2^{ου}-3^{ου} σταδίου που είχαν κατασταλασμένη την έκφραση της β5 υπομονάδας (B1) ή της ρυθμιστικής Rpn11 υπομονάδας (B2). (Γ) Μονάδες φθορισμού των επιπέδων ROS σε ολόκληρα σώματα λαρβών 2^{ου}-3^{ου} σταδίου που είχαν κατασταλασμένη την έκφραση της β5 υπομονάδας. Σε όλες τις περιπτώσεις ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν λάρβες (του ίδιου σταδίου ανάπτυξης) της πατρικής γενεάς (UAS β5 ή UAS rpn11 ή Gal4) ή λάρβες που είχαν κατασταλασμένη την έκφραση ενός “non fly gene”, συγκεκριμένα του *mcherry* (*mcherry* RNAi). Control, δείγμα μάρτυρας. Τυπική απόκλιση ± SD, *, P<0.05, **, P<0.01.

Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνουν πλήρως τις παρατηρήσεις που καταγράφηκαν μετά τη χορήγηση του ειδικού πρωτεασωμικού αναστολέα PS-341 (φαρμακολογικό μοντέλο *in vivo* αναστολής του πρωτεασώματος).

4.14 Η χορήγηση μέσω της τροφής τροποποιημένων AGEs ή λιποφουσκίνης σε νεαρά έντομα προκαλεί πρόωμη γήρανση, καθώς και αύξηση των οξειδωμένων πρωτεϊνών και των ενδογενών επιπέδων των πρωτεϊνών που έχουν τροποποιηθεί με AGEs

Όπως ήδη αναφέρθηκε, κατά τη γήρανση παρατηρήθηκε αύξηση των πρωτεϊνών που έχουν τροποποιηθεί με AGEs καθώς και των οξειδωμένων πρωτεϊνών στους σωματικούς ιστούς των εντόμων *Drosophila*. Ακόμη, όπως αναφέρεται στην βιβλιογραφία κατά τη γήρανση συσσωρεύονται τροποποιήσεις, που δημιουργούνται από οξειδωμένους και γλυκοζυλιωμένους παράγοντες, με αποτέλεσμα τη δημιουργία έντονα οξειδωμένων, αδιάλυτων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων γνωστών ως λιποφουσκίνη• επίσης παρατηρείται αυξημένη τροποποίηση των πρωτεϊνών από τα ώριμα τελικά προϊόντα γλυκοζυλίωσης (AGEs) (Jung et al., 2007; Nedic et al., 2013). Δεδομένων των παραπάνω, καθώς και ότι πολλά τρόφιμα που καταναλώνουμε καθημερινά είναι πλούσια σε AGEs ή λιποφουσκίνη (Assar et al., 2009) η μελέτης μας εστιάστηκε στη συνέχεια στην *in vivo* επίδραση διατροφικών AGEs και της λιποφουσκίνης στη φυσιολογία και μακροβιότητα της *Drosophila*.

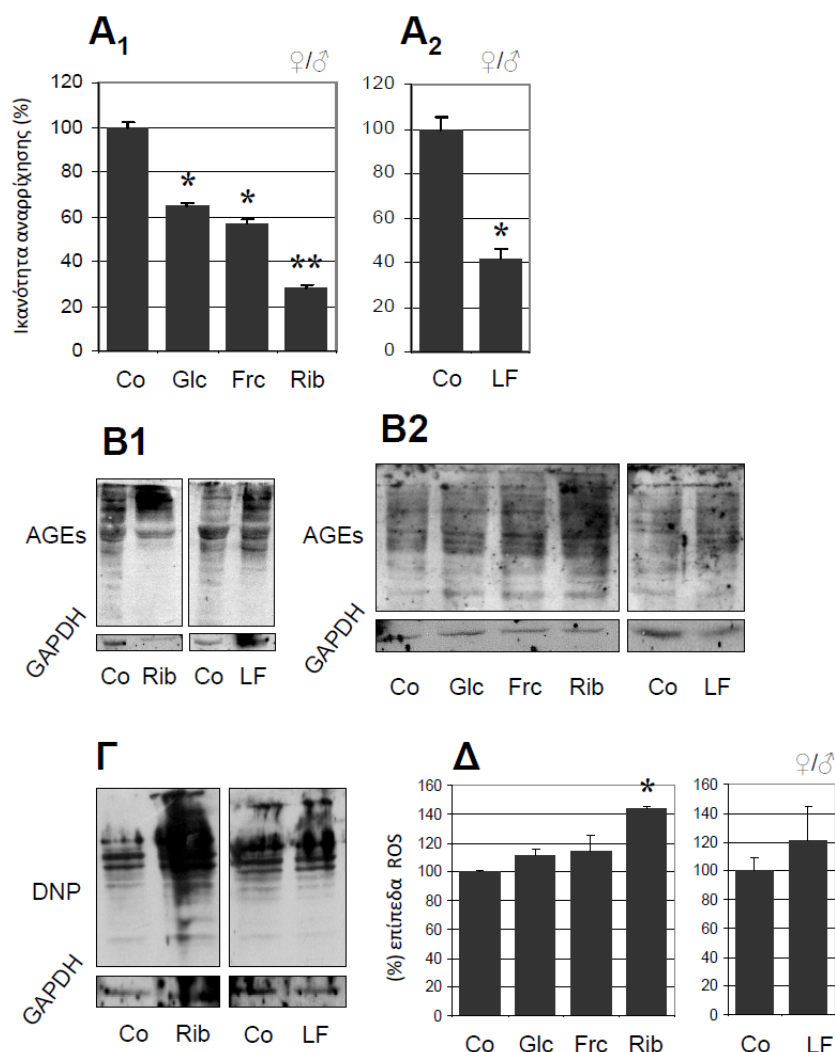
Αρχικά, μελετήσαμε εάν η προσθήκη των AGEs ή λιποφουσκίνης στην τροφή των εντόμων επηρεάζει την πρόσληψη τροφής των εντόμων. Όπως φαίνεται στην Εικ. 4.35, δεν παρατηρήθηκε επίδραση στην κατανάλωση της τροφής μετά από την προσθήκη πρωτεΐνης τροποποιημένης με διάφορα AGEs ή λιποφουσκίνης.



Εικόνα 4.35. Η πρόσθηση AGEs ή λιποφουσκίνης στην τροφή των εντόμων δεν επηρεάζει το ρυθμό πρόσληψης τροφής. Βαθμός κοιλιακής ερυθρότητας των εντόμων που εκτέθηκαν σε κανονική τροφή ή σε τροφή που περιείχε 0,25 mmol σάκχαρο [Γλυκόζης (Glc), Φρουκτόζης (Frc), Ριβόζης (Rib)]-0,25 mg BSA (3,76 μ M τροποποιημένη BSA από τα σάκχαρα-) ανά ml τροφής ή λιποφουσκίνη 0,1 mg/ mL. Co, δείγμα μάρτυρα.

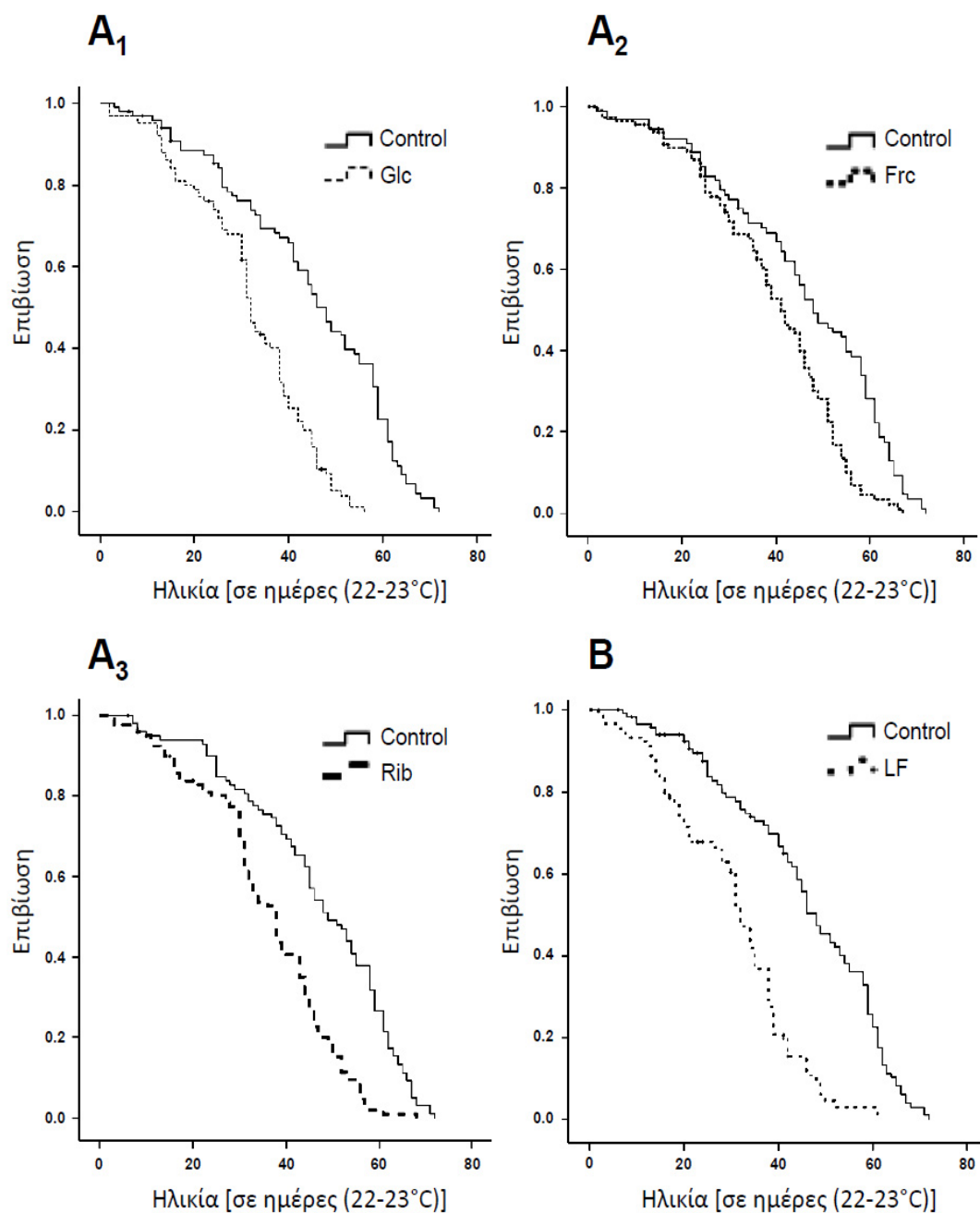
Στη συνέχεια, βρέθηκε ότι η παρατεταμένη πρόσληψη τροφής, που είναι εμπλουτισμένη σε πρωτεΐνες τροποποιημένες με AGEs ή σε λιποφουσκίνη, προκαλεί μείωση της κινητικής ικανότητας των εντόμων (Εικ. 4.36Α). Από όλες τις δοκιμές, η προσθήκη του AGE D-ribose-BSA βρέθηκε να προκαλεί την ισχυρότερη επίδραση (Εικ. 4.36Α1). Καθώς, όπως ήδη αναφέραμε, ο σωματικός ιστός και οι γονάδες παρουσιάζουν διαφορετικό ρυθμό γήρανσης, οι αναλύσεις μας στη συνέχεια εστιάστηκαν στους σωματικούς ιστούς των εντόμων.

Όπως φαίνεται στην Εικ. 4.36Β, η προσθήκη όλων των ουσιών (αλβουμίνη του ορού τροποποιημένη με διαφορετικά AGEs ή λιποφουσκίνη) στην τροφή των εντόμων αύξησε τα ενδογενή επίπεδα των πρωτεϊνών που έχουν τροποποιηθεί με AGEs τόσο στην αιμολέμφο, όσο και στους ιστούς του κεφαλιού (που αποτελείται κυρίως από νευρικό ιστό) και του θώρακα (που αποτελείται κυρίως από μυϊκό ιστό). Επίσης, βρέθηκε ότι τα AGEs D-Ribose-BSA προκαλούν συσσώρευση ενδογενών πρωτεϊνών που έχουν τροποποιηθεί με AGEs. Η έκθεση των εντόμων σε AGEs ή λιποφουσκίνη οδήγησε σε αύξηση του οξειδωτικού στρες (Εικ. 4.36 Γ,Δ), ενώ τροφή πλούσια σε D-ribose- BSA ή λιποφουσκίνη προκάλεσε συσσώρευση οξειδωμένων πρωτεϊνών (Εικ. 4.36Γ). Ακόμη, η έκθεση των εντόμων σε τροφή πλούσια σε AGEs ή λιποφουσκίνη προκάλεσε αύξηση του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου (ROS) στους σωματικούς ιστούς των εντόμων (Εικ. 4.36Δ).



Εικόνα 4.36 Η παρατεταμένη λήψη τροφής πλούσιας σε AGEs [αλβουμίνη ορού τροποποιημένη με γλυκόζη (Glc)-, φρουκτόζη (Frc)-, ή ριβόζη (Rib)] ή λιποφουσκίνη (LF), από νεαρά έντομα προκαλεί μείωση της κινητικής ικανότητας των εντόμων, συσσώρευση των οξειδωμένων πρωτεϊνών και πρωτεϊνών που έχουν τροποποιηθεί με AGEs καθώς και αύξηση του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου. (Α) Σχετική (%) κινητική ικανότητα σε νεαρά θηλυκά και αρσενικά έντομα τα οποία εκτέθηκαν για 30 ημέρες σε τροφή πλούσια σε AGEs (3,76 μ M τροποποιημένη με σάκχαρο BSA) (A1) ή σε λιποφουσκίνη (0.1 mg/mL) (A2). (B-Γ) Αντιπροσωπευτικό ανοσοστύπωμα των κυτταρικών πρωτεϊνών που έχουν τροποποιηθεί με AGEs (B) και των οξειδωμένων (καρβονυλιωμένων) πρωτεϊνών (Γ) σε δείγματα από αιμολέμφο (B1) και σε σωματικούς ιστούς (B2, Γ) από νεαρά έντομα που εκτέθηκαν σε AGEs ή λιποφουσκίνη για 21 ημέρες. (Δ) Σχετικά (%) επίπεδα ROS σε σωματικούς ιστούς από έντομα που εκτέθηκαν σε AGEs ή λιποφουσκίνη για 10 ημέρες. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για τον έλεγχο του ισοφορτώματος. Co, δείγμα μάρτυρα. Τυπική απόκλιση, $\pm$ SD, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Τέλος, σε δοκιμές μακροβιότητας βρέθηκε ότι η παρατεταμένη χορήγηση τροφής πλούσια σε AGEs ή λιποφουσκίνη σε νεαρά έντομα οδηγεί στη σημαντική μείωση του προσδόκιμου ζωής (Εικ. 4.37). Αξίζει να σημειωθεί ότι η σημαντικότερη μείωση του προσδόκιμου ζωής εμφανίστηκε στα έντομα που καλλιεργήθηκαν σε τροφή εμπλουτισμένη με λιποφουσκίνη.



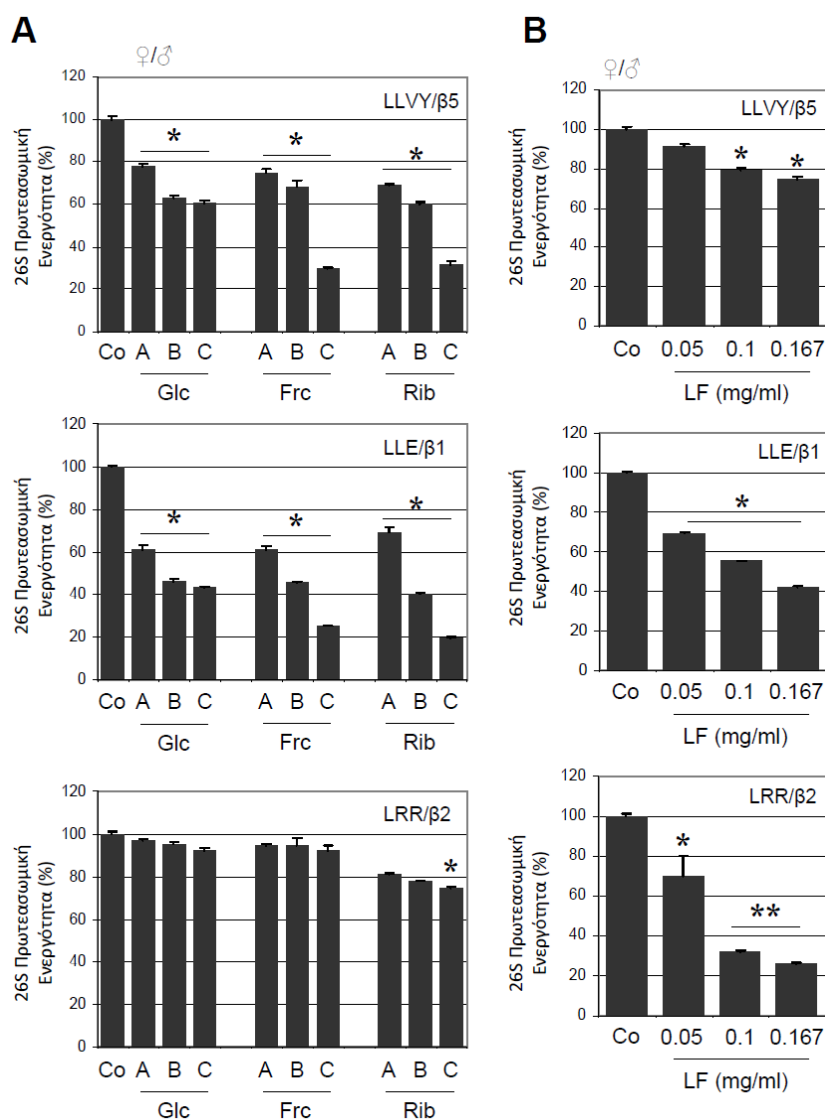
Εικόνα 4.37 Η παρατεταμένη λήψη τροφής πλούσιας σε AGEs [αλβουμίνη ορού τροποποιημένη με γλυκόζη (Glc)-, φρουκτόζη (Frc)-, ή ριβόζη (Rib)] ή λιποφουσκίνη (LF) προκαλεί μείωση του προσδόκιμου ζωής των εντόμων. (A, B) Αντιπροσωπευτικές καμπύλες μακροβιότητας των εντόμων που εκτέθηκαν στα αναγραφόμενα AGEs (3,76 μ M τροποποιημένη με σάκχαρο BSA) (A) και σε λιποφουσκίνη (0.1 mg/mL) (B). Οι μέσοι όροι και οι στατιστικές αναλύσεις των καμπυλών μακροβιότητας αναφέρονται στον Πίνακα 4 του παραρτήματος I. Control, άτομα μάρτυρες.

Συμπερασματικά, η λήψη τροφής πλούσιας σε AGEs ή λιποφουσκίνη διαταράσσει την πρωτεόσταση και προκαλεί μείωση του προσδόκιμου ζωής.

4.15 Η λήψη τροφής πλούσια σε AGEs ή λιποφουσκίνη μειώνει την ενζυμική ενεργότητα του πρωτεασώματος

Δεδομένου ότι όπως έχει δειχθεί η λιποφουσκίνη αναστέλλει την πρωτεασωματική ενεργότητα σε ανθρώπινα κύτταρα (Hohn et al., 2010, 2011), στη συνέχεια, μελετήθηκε η *in vivo* επίδραση των τροποποιημένων πρωτεϊνών με AGEs ή της λιποφουσκίνης στη λειτουργία του πρωτεασώματος.

Αρχικά, διερευνήθηκε η *in vitro* επίδραση των AGEs ή της λιποφουσκίνης στην ενεργότητα του πρωτεασώματος. Τα πειράματά μας έδειξαν ότι η προσθήκη των AGEs ή της λιποφουσκίνης κατευθείαν στο πρωτεϊνικό λύμα από σωματικούς ιστούς εντόμων (το οποίο περιέχει ενεργά πρωτεασώματα) προκάλεσε καταστολή της 26S πρωτεασωματικής ενεργότητας με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο (Εικ. 4.38 Α, Β).

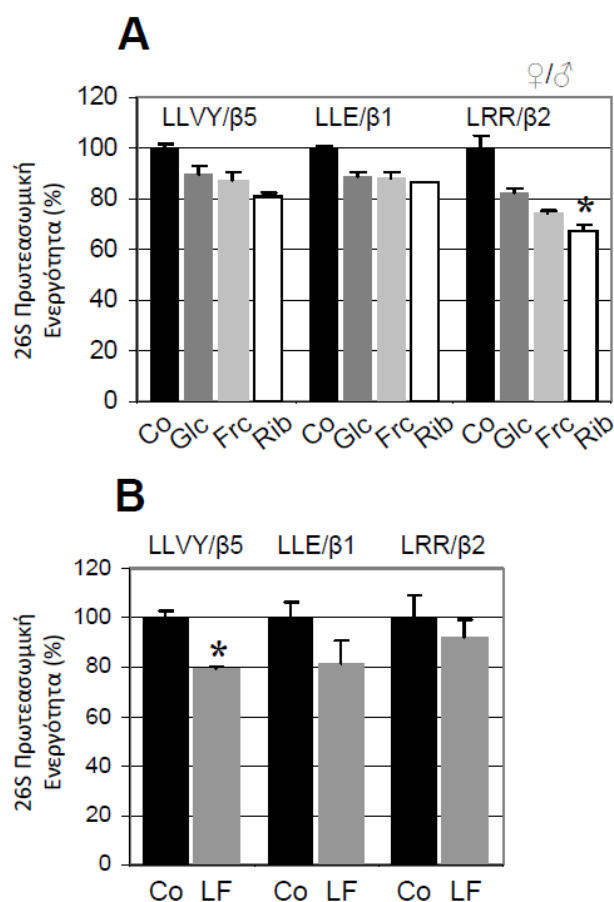


Εικόνα 4.38 *In vitro* επίδραση των AGEs και της λιποφουσκίνης στην 26S πρωτεασωματική ενεργότητα. (Α, Β) Σχετική (%) 26S πρωτεασωματική ενεργότητα (*in vitro*) μετά από προσθήκη των αναγραφόμενων AGEs (Α: 3.76 μM τροποποιημένη με σάκχαρα, Β:

5 μ M τροποποιημένη με σάκχαρα BSA, C: 7.5 μ M τροποποιημένη με σάκχαρα BSA) (A) ή της λιποφουσκίνης (στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις) (B) κατευθείαν στο πρωτεϊνικό λύμα σωματικών ιστών εντόμων το οποίο περιέχει ενεργά πρωτεασώματα. Co, δείγμα μάρτυρας. Τυπική απόκλιση $\pm$ SD, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

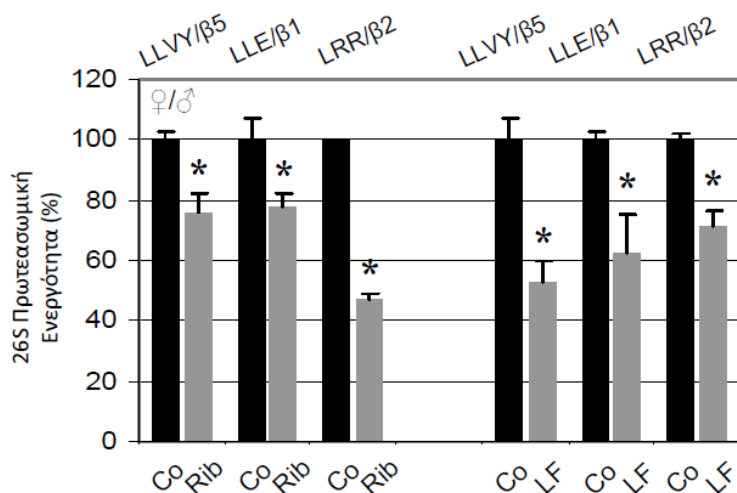
Επίσης, σε πειράματα, όπου προηγήθηκε χορήγηση τροφής πλούσιας σε AGEs ή σε λιποφουσκίνη σε νεαρά έντομα για 4 ημέρες, παρατηρήθηκε μείωση της *in vivo* 26S πρωτεασωματικής ενεργότητας στους σωματικούς ιστούς των εντόμων.

Αποτελεί ενδιαφέρουσα παρατήρηση ότι, όπως και στα προηγούμενα πειράματα, η εντονότερη μείωση της ενεργότητας του πρωτεασώματος παρατηρήθηκε παρουσία του AGE D-ribose-BSA (Εικ. 4.39).



Εικόνα 4.39 Η σύντομη έκθεση νεαρών εντόμων σε τροφή πλούσια σε AGEs [αλβουμίνη ορού τροποποιημένη με γλυκόζη (Glc)-, φρουκτόζη (Frc)-, ή ριβόζη (Rib)] ή λιποφουσκίνη (LF) προκαλεί ήπια μείωση της 26S πρωτεασωματικής ενεργότητας. (A, B) Σχετική (%) 26S πρωτεασωματική ενεργότητα σε σωματικούς ιστούς (ιστοί από κεφάλι και θώρακα) νεαρών εντόμων που εκτέθηκαν για 4 ημέρες στα αναγραφόμενα AGEs (3,76 μ M τροποποιημένη με σάκχαρα BSA) (A) ή σε λιποφουσκίνη (0.1 mg/ml) (B). Co, δείγμα μάρτυρας. Τυπική απόκλιση $\pm$ SD, *, $P < 0.05$.

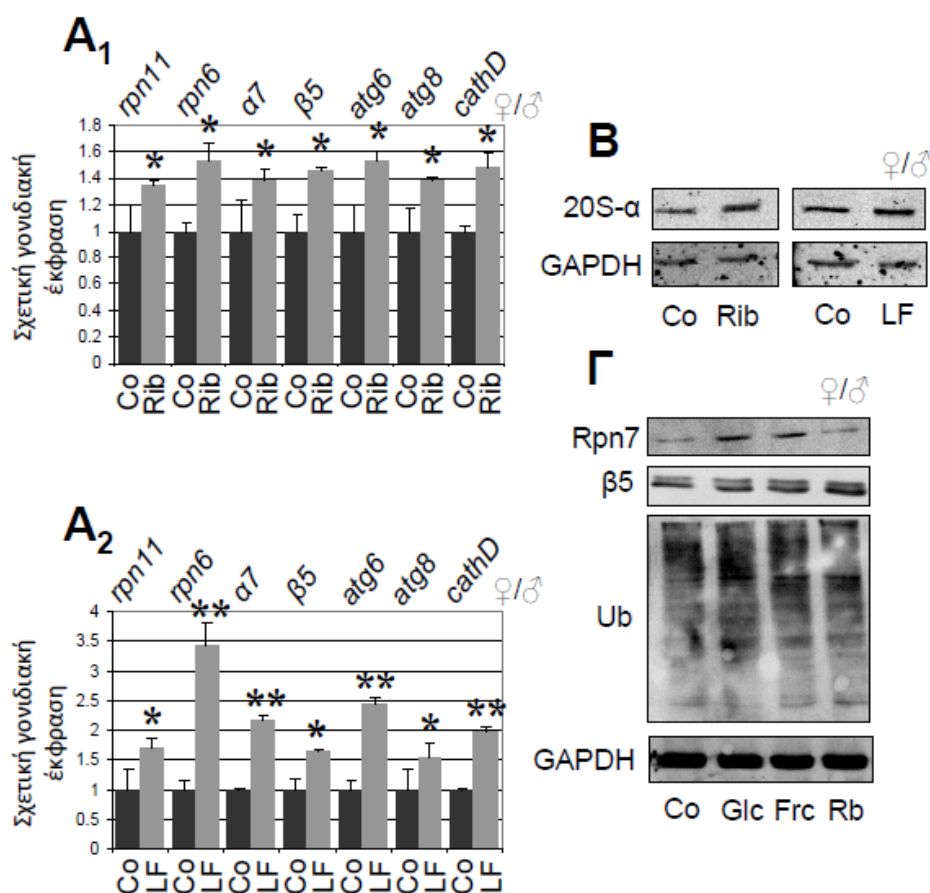
Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω, καθώς η παρατεταμένη λήψη τροφής πλούσιας σε AGEs ή σε λιποφουσκίνη οδήγησε σε εντονότερη και σημαντικά μεγαλύτερη μείωση της 26S πρωτεασωματικής ενεργότητας στους σωματικούς ιστούς των εντόμων (Εικ. 4.40).



Εικόνα 4.40 Η παρατεταμένη έκθεση νεαρών εντόμων σε τροφή πλούσια σε AGEs [αλβουμίνη ορού τροποποιημένη με γλυκόζη (Glc)-, φρουκτόζη (Frc)-, ή ριβόζη (Rib)] ή λιποφουσκίνη (LF) προκαλεί σημαντική *in vivo* μείωση της 26S πρωτεασωματικής ενεργότητας. Σχετική (%) 26S πρωτεασωματική ενεργότητα σε σωματικούς ιστούς από νεαρά έντομα που εκτέθηκαν για 10 ημέρες στα αναγραφόμενα AGEs (3,76 μ M τροποποιημένη με σάκχαρο BSA) (A) ή σε λιποφουσκίνη (0.1 mg/ml) (B). Co, δείγμα μάρτυρα. Τυπική απόκλιση, $\pm$ SD, *, $P < 0.05$.

Ακόμη, διαπιστώθηκε ότι η έκθεση των εντόμων σε AGEs ή σε λιποφουσκίνη προκάλεσε την αύξηση της γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεασωματικών υπομονάδων στους σωματικούς ιστούς των εντόμων (Εικ. 4.41A1, B, Γ).

Είναι ενδιαφέρον βέβαια ότι η επαγωγή αυτή δε δύναται να επαναφέρει την ομαλή λειτουργία του πρωτεασώματος (Εικ. 4.40). Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης των αυτοφαγικών γονιδίων *atg6*, *atg8*, καθώς και του γονιδίου της καθεψίνης D, *cathD* (Εικ. 4.41A₂).



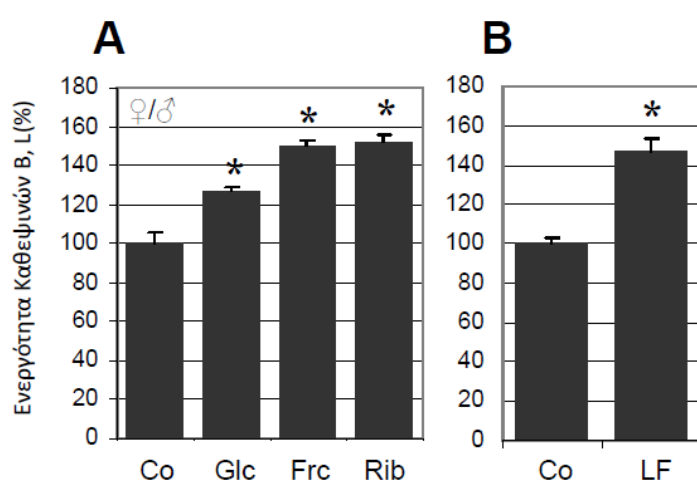
Εικόνα 4.41 Η έκθεση των εντόμων σε AGEs [αλβουμίνη τροποποιημένη με γλυκόζη (Glc)-, φρουκτόζη (Frc)-, ή ριβόζη (Rib)] ή λιποφουσκίνη (LF) επάγει την αύξηση της έκφρασης πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην πρωτεόσταση. (Α) Σχετικά επίπεδα έκφρασης (με τη χρήση Q-RT-PCR) των γονιδίων *rpn11*, *rpn6*, *a7*, *β5*, *atg6*, *atg8* και *cathD* σε σωματικούς νεαρών εντόμων που εκτέθηκαν για 10 ημέρες σε AGEs [τροποποιημένη BSA με ριβόζη (Rib) (3,76 μM)] (A1) ή σε λιποφουσκίνη (0.1 mg/ml) (A2). (B, Γ) Αντιπροσωπευτικό ανοσοστύπωμα έναντι των πρωτεϊνών 20S-α (B) ή Rpn7, β5 και ουβικιτίνης (Ub) (Γ) μετά από έκθεση των εντόμων στα αναγραφόμενα AGEs (3,76 μM τροποποιημένη με σάκχαρα BSA) ή λιποφουσκίνη (0.1 mg/ml) για 10 (B) και 25 (Γ) ημέρες. Το γονίδιο *rp49* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς και η πρωτεΐνη GAPDH ως πρωτεΐνη αναφοράς για τον έλεγχο του ισοφορτώματος. Co, δείγμα μάρτυρας. Τυπική απόκλιση ± SD, *, P<0.05, **, P<0.01.

Συμπερασματικά, η λήψη τροφής πλούσιας σε AGEs ή λιποφουσκίνη προκαλεί πρωτεασωματική δυσλειτουργία.

4.16 Η παρατεταμένη λήψη τροφής πλούσιας σε AGEs ή λιποφουσκίνη προκαλεί αύξηση της ενεργότητας των καθεψινών του λυσοσώματος, οι οποίες συμβάλλουν στη μείωση της κυτταροτοξικότητας που προκαλούν τα AGEs ή η λιποφουσκίνη

Δεδομένου ότι, όπως έχει δειχθεί πρόσφατα, οι λυσοσωμικές καθεψίνες εμπλέκονται στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών που έχουν τροποποιηθεί με AGEs (Grimm et al., 2010) και δεδομένου ότι παρατηρήθηκε αύξηση της γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων *atg6*, *atg8* και *cathD* στα έντομα που εκτέθηκαν σε τροφή πλούσια σε AGEs ή σε λιποφουσκίνη, στη συνέχεια, μελετήθηκε η ενεργότητα των καθεψινών σε σωματικούς ιστούς εντόμων που έλαβαν τροφή πλούσια σε AGEs ή σε λιποφουσκίνη.

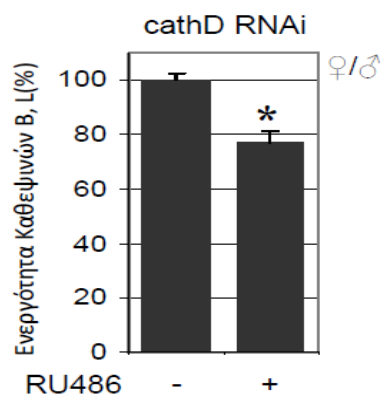
Όπως φαίνεται στην Εικ. 4.42, η λήψη τροφής πλούσια σε AGEs ή λιποφουσκίνη αυξάνει την ενεργότητα των καθεψινών B και L. Όπως και στα προηγούμενα πειράματα, το AGE, D-ribose-BSA βρέθηκε να εμφανίζει τον ισχυρότερο φαινότυπο, αφού επάγει την εντονότερη αύξηση ενεργότητας των καθεψινών.



Εικόνα 4.42 Η τροφή πλούσια σε AGEs [BSA τροποποιημένη με γλυκόζη (Glc)-, φρουκτόζη (Frc)-, ή ριβόζη (Rib)] ή λιποφουσκίνη (LF) επάγει την ενεργοποίηση των καθεψινών. (A, B) Σχετική (%) ενεργότητα των καθεψινών B και L σε σωματικούς ιστούς από έντομα που εκτέθηκαν για 10 ημέρες στα αναγραφόμενα AGEs (3,76 μ M τροποποιημένη BSA από τα σάκχαρα) (A) ή σε λιποφουσκίνη (0.1 mg/ml) (B). Όπου Co το δείγμα μάρτυρας. Οι μπάρες των σφαλμάτων: $\pm$ SD, *, $P < 0.05$.

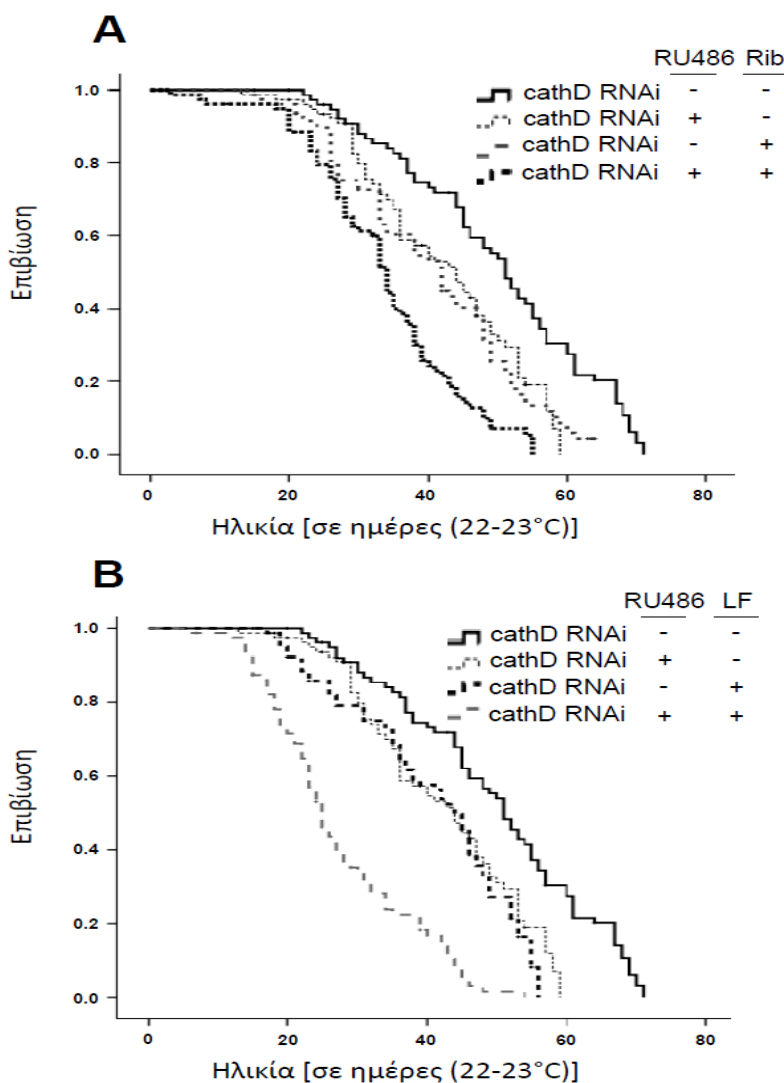
Στη συνέχεια, προκειμένου να κατανοήσουμε καλύτερα το ρόλο των καθεψινών στις κυτταρικές αποκρίσεις μετά από κατανάλωση τροφής πλούσιας σε AGEs ή σε λιποφουσκίνη χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά έντομα, στα οποία η έκφραση της καθεψίνης D ήταν κατασταλαμένη μέσω της τεχνικής RNAi.

Όπως και πριν, χρησιμοποιήθηκε το επαγόμενο σύστημα έκφρασης του διαγονιδίου μέσω της ορμόνης RU486. Οι αρχικές μελέτες μας σε κανονική τροφή έδειξαν ότι τα διαγονιδιακά αυτά έντομα εμφάνισαν μείωση της ενεργότητας των καθεψινών B, L (Εικ. 4.43), καθώς και μειωμένο προσδόκιμο ζωής (Εικ. 4.44).



Εικόνα 4.43 Η καταστολή της έκφρασης της καθεψίνης D οδηγεί σε μείωση της ενεργότητας των καθεψινών B, L. Σχετική (%) ενεργότητα των καθεψινών B, L σε σωματικούς ιστούς από διαγονιδιακά έντομα που εκτέθηκαν στην ορμόνη RU486 για 8 ημέρες. Οι μπάρες των σφαλμάτων: $\pm$ SD, *, $P < 0.05$.

Επιπλέον, βρέθηκε ότι, όταν τα διαγονιδιακά έντομα με κατασταλμένη την έκφραση της καθεψίνης D εκτέθηκαν σε τροφή πλούσια σε AGEs (και ειδικότερα D-ribose-BSA) ή σε τροφή εμπλουτισμένη με λιποφουσκίνη εμφάνισαν εντονότερη μείωση του προσδόκιμου ζωής σε σύγκριση με τα έντομα μάρτυρες που εκτέθηκαν σε ίδιες συνθήκες (Εικ. 4.44).



Εικόνα 4.44 Διαγονιδιακά έντομα με κατασταλμένη την έκφραση της καθεψίνης D εμφάνισαν μεγάλη ευαισθησία παρουσία τροφής πλούσια σε AGEs [BSA τροποποιημένη με ριβόζη (Rib)] ή λιποφουσκίνη (LF). Αντιπροσωπευτικές καμπύλες μακροβιότητας των διαγονιδιακών εντόμων απουσία [cathepsin D RNAI(-)] ή παρουσία [cathepsin D RNAI(+)] της ορμόνης RU486 σε φυσιολογική τροφή ή σε τροφή με το AGE, BSA τροποποιημένη με ριβόζη (Rib) (3,76 μ M τροποποιημένη BSA από τη ριβόζη) (A) ή με λιποφουσκίνη (0.1 mg/ml) (B). Οι μέσοι όροι και οι στατιστικές αναλύσεις των καμπυλών μακροβιότητας αναφέρονται στον Πίνακα 4 του παραρτήματος I.

Συμπεραίνουμε ότι οι λυσοσωμικές καθεψίνες συμμετέχουν στη μείωση της τοξικότητας που προκαλείται λόγω έκθεσης σε τροφή πλούσια σε AGEs ή λιποφουσκίνη.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η γήρανση αποτελεί μια αναπόφευκτη διαδικασία για σχεδόν όλους τους οργανισμούς και εξαρτάται τόσο από γενετικούς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Σχετίζεται δε με τη σταδιακή συσσώρευση μη λειτουργικών πρωτεϊνών και οργανιδίων που τελικά οδηγούν στη διαταραχή της ομοιοστασίας (ή ομοιοδυναμικής) του κυττάρου και τελικά στον θάνατο (Kirkwood, 2000; Kourtis και Tavernarakis, 2011).

Στην παρούσα μελέτη, βρέθηκε ότι η γήρανση στη *Drosophila* σχετίζεται άμεσα με τη διαταραχή της πρωτεόστασης και ειδικότερα με τη δυσλειτουργία του πρωτεασώματος. Η εμφάνιση της δυσλειτουργίας αυτής δεν εξαρτάται από το φύλο και εκδηλώνεται κυρίως στους σωματικούς ιστούς. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η μείωση της πρωτεασωματικής ενζυμικής ενεργότητας, καθώς και της έκφρασης (τόσο σε επίπεδο γονιδίου όσο και πρωτεΐνης) των πρωτεασωματικών υπομονάδων στους σωματικούς ιστούς των εντόμων εκδηλώνεται ήδη από τα μέσης ηλικίας έντομα. Τα αποτελέσματά μας επίσης έδειξαν ότι κατά την εξέλιξη του γήρατος επηρεάζεται (μειορρυθμίζεται) σε εντονότερο βαθμό η 26S ενεργότητα του πρωτεασώματος σε σχέση με την 20S πρωτεασωματική ενεργότητα. Η παρατήρηση αυτή συνάδει με το εύρημα ότι κατά το *in vivo* γήρας στη *Drosophila* παρατηρείται πιο έντονη μειορύθμιση των υπομονάδων του ρυθμιστικού 19S πρωτεασώματος. Πιθανολογούμε ότι το εύρημα αυτό σχετίζεται με το γεγονός ότι το 20S πρωτεάσωμα είναι απαραίτητο για την απομάκρυνση των οξειδωμένων πρωτεϊνών που συσσωρεύονται προοίους της ηλικίας (Breusing και Grune, 2008; Pickering και Davies, 2012), καθώς και με την παρατήρηση ότι το 20S πρωτεάσωμα είναι πιο ανθεκτικό (σε σχέση με το 26S) στο οξειδωτικό στρες (Reinheckel et al., 1998).

Σε συμφωνία με τα ευρήματά μας [και σε αντίθεση με μία μελέτη που έδειξε αύξηση της έκφρασης των πρωτεασωματικών γονιδίων κατά τη γήρανση στη *Drosophila* (Girardot et al., 2006)]• άλλες δύο μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν ολόκληρα έντομα (σωματικοί και αναπαραγωγικοί ιστοί) αναφέρουν μείωση της έκφρασης και της ενεργότητας του 26S πρωτεασώματος σε μέσης ηλικίας έντομα (Vernace et al., 2007; Tonoki et al., 2009). Η αναφορά (των δύο παραπάνω εργασιών) ότι η ενεργότητα του 20S πρωτεασώματος δε φαίνεται να αλλάζει κατά τη γήρανση πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι οι αναλύσεις στις συγκεκριμένες εργασίες έγιναν σε ολόκληρα έντομα (σωματικός και αναπαραγωγικός ιστός) μέσης ηλικίας, καθώς, σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η 20S ενεργότητα του πρωτεασώματος μειώνεται κυρίως στους γηρασμένους σωματικούς ιστούς.

Επιπλέον, τα ευρήματά μας έδειξαν ότι τα αυξημένα επίπεδα των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) που παρατηρούνται στους ιστούς των γονάδων δεν σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα τροποποιημένων πρωτεϊνών και πρωτεωμική αστάθεια ή με την ενεργοποίηση των στοιχείων αντιοξειδωτικής απόκρισης. Επίσης, δείχθηκε ότι οι γονάδες των γηρασμένων

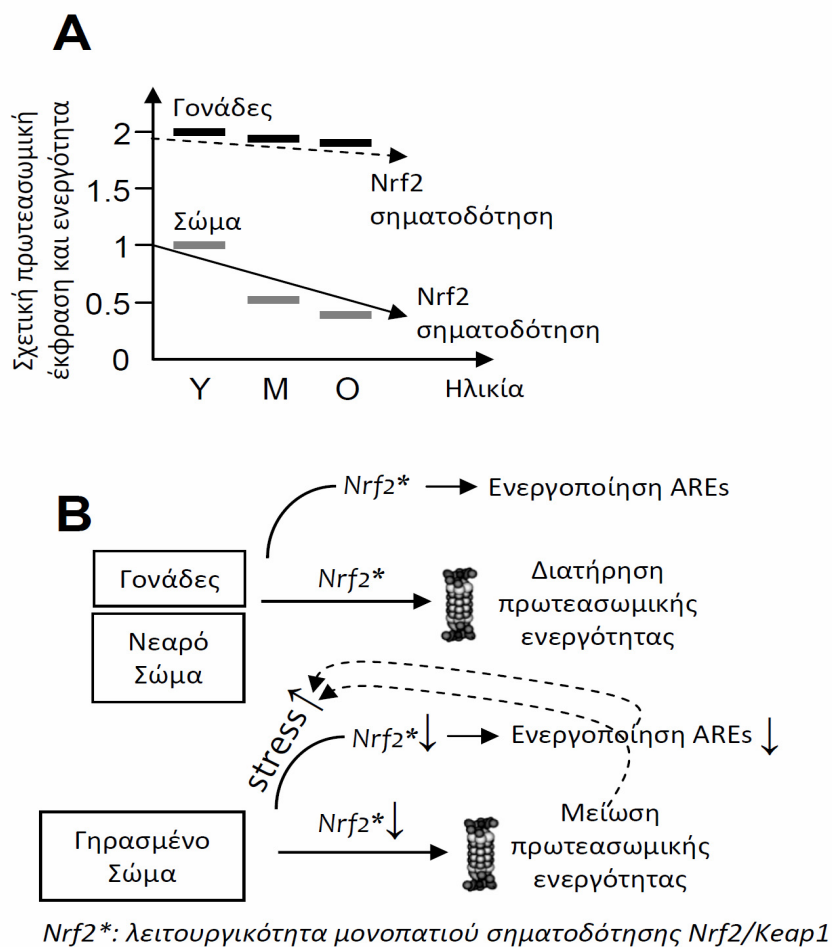
ατόμων διατηρούν σταθερά (ή και σε κάποιες περιπτώσεις αυξημένα) επίπεδα έκφρασης και ενζυμικής ενεργότητας του πρωτεασώματος. Ακόμη, οι νεαρές γονάδες διαθέτουν πιο άφθονα και πιο (ενζυμικά) ενεργά πρωτεασώματα σε σύγκριση με τους νεαρούς σωματικούς ιστούς. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι το πρωτέωμα των γονάδων διατηρείται «λειτουργικό» καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής, προκειμένου να διαφυλαχθεί η μεταβίβαση ενός ακέραιου πρωτεώματος στην επόμενη γενεά. Σε συμφωνία με τα ευρήματά μας αυτά, δείχθηκε πρόσφατα στη ζύμη ότι κατά την κυτταρική εκβλάστηση, τα μητρικά κύτταρα διακρατούν τις οξειδωμένες και τροποποιημένες πρωτεΐνες, προκειμένου τα θυγατρικά κύτταρα να φέρουν όσο το δυνατόν πιο λειτουργικό πρωτέωμα (Aguilaniu et al., 2003). Επίσης, έχειδειχθεί ότι κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγής στο *Caenorhabditis elegans*, η απομάκρυνση των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών εξαρτάται από τη λειτουργία του πρωτεασώματος, καθώς και ότι η εξάλειψη των μη λειτουργικών πρωτεϊνών κατά τη διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων συμπίπτει με αυξημένα επίπεδα ενζυμικής ενεργότητας του 20S πρωτεασώματος (Hernebring et al., 2006). Πρόσφατα (και καθώς η παρούσα ΔΔ ήταν σε εξέλιξη), δείχθηκε στο *C. elegans* ότι η εξάλειψη της γαμετικής σειράς οδηγεί στην αύξηση της πρωτεασωμικής ενζυμικής ενεργότητας• τη μείωση των επιπέδων των μη λειτουργικών πρωτεϊνών, καθώς και στην αύξηση του προσδόκιμου ζωής (Vilchez et al., 2012a). Η αύξηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας συσχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης της πρωτεασωμικής υπομονάδας Rpn-6. Το γονίδιο *rpn-6* βρέθηκε επίσης να υπερεκφράζεται και σε ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (Vilchez et al., 2012b), ενώ δείχθηκε και από εμάς, (στην παρούσα μελέτη) ότι υπερεκφράζεται στο αναπαραγωγικό ιστό της *Drosophila*. Επιπλέον, μία πρόσφατη μελέτη από τους Fredriksson et al. (2013) έδειξε ότι τα ωοθυλάκια της *Drosophila* διαθέτουν αυξημένη πρωτεασωμική ενεργότητα και μειωμένα επίπεδα οξειδωμένων πρωτεϊνών σε σύγκριση με τους σωματικούς ιστούς. Επίσης, στα πλαίσια της συγκεκριμένης μελέτης διαπιστώθηκε μείωση της 26S πρωτεασωμικής ενεργότητας στα έντομα μέσης ηλικίας, αλλά όχι της 20S, κάτι που πιθανόν εξηγείται από το εύρημά μας ότι η 20S πρωτεασωμική ενεργότητα μειώνεται κυρίως στα γηρασμένα έντομα.

Η παρούσα ΔΔ προσθέτει σημαντικές επιπλέον πληροφορίες σε σχέση με τα ευρήματα των Fredriksson et al. (2013) και την ανάλυση του μηχανισμών ρύθμισης του πρωτεασώματος κατά τη γήρανση, καθώς μελετήθηκε για πρώτη φορά η *in vivo* ρύθμιση του πρωτεασώματος και της αντιοξειδωτικής απόκρισης ως συνάρτηση του φύλου, του ιστού, του στρες και της ηλικίας. Επίσης, συσχετίστηκε το σηματοδοτικό μονοπάτι Nrf2/Keap1 με τη διαφορετική ρύθμιση της πρωτεόστασης στους σωματικούς ιστούς σε σύγκριση με τους ιστούς των γονάδων. Πιο συγκεκριμένα, δείχθηκε ότι οι γονάδες είναι πιο ανθεκτικές σε σχέση με το σώμα τόσο στο οξειδωτικό όσο και στο πρωτεοτοξικό στρες, ανεξάρτητα από την ηλικία. Φαίνεται ότι η ιδιαίτερη αυτή ανθεκτικότητα, παρουσία οξειδωτικού στρες,

οφείλεται στην αυξημένη (σε σχέση με το σώμα) ενεργότητα του πρωτεασώματος που παρατηρήθηκε στις γονάδες, καθώς και στα αυξημένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *cncC* και *keap1* που συμμετέχουν στο κύριο σηματοδοτικό μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης. Το παραπάνω εύρημα ενδεχομένως μπορεί να εξηγηθεί και από το γεγονός ότι τα πρωτεασώματα των σωματικών ιστών είναι πιο εκτεθειμένα σε στρεσογόνους παράγοντες σε σχέση με τις γονάδες και ως εκ τούτου υπόκεινται σε περισσότερες τροποποιήσεις.

Επίσης, για πρώτη φορά στα πλαίσια της παρούσας ΔΔ δείχθηκε ότι η διαφορική ρύθμιση του πρωτεασώματος κατά την *in vivo* γήρανση, αλλά και ανάμεσα στους σωματικούς και αναπαραγωγικούς ιστούς εξαρτάται από το σηματοδοτικό μονοπάτι Nrf2(CncC)/Keap1. Ένα καίριο ερώτημα φυσικά αφορά στο γιατί, αφού η έκφραση του γονιδίου *cncC* δε μειώνεται κατά τη γήρανση, το μονοπάτι σηματοδότησης του Nrf2(*cncC*) καθίσταται μη λειτουργικό ειδικά στους σωματικούς ιστούς. Δεδομένου ότι τα ευρήματά μας έδειξαν (βλέπε παρακάτω) ότι δεν υπάρχει κάποια ηλικιο- εξαρτώμενη μεταβολή στη χρωματίνη που να εμποδίζει την πρόσβαση του μεταγραφικού παράγοντα CncC στα γονίδια στόχους, πιθανολογούμε ότι πρωτεΐνες όπως ο CncC ή οι Keap1 και Maf υπόκεινται σε μεταφραστικές τροποποιήσεις και καθίστανται μη λειτουργικές κατά τη γήρανση. Αυτή η υπόθεση (αν και χρήζει περαιτέρω πειραματικής απόδειξης) ίσως εξηγεί τη λειτουργικότητα του σηματοδοτικού μονοπατιού Nrf2(CncC)/Keap1 στις γονάδες, όπου ανεξαρτήτως ηλικίας δεν παρατηρείται πρωτεωμική αστάθεια. Μια εναλλακτική εξήγηση θα μπορούσε ενδεχομένως να αφορά σε ενεργοποίηση ειδικών στοιχείων αντιοξειδωτικής απόκρισης (AREs) στις γονάδες, προκειμένου να συντηρηθεί η έκφραση κάποιων γονιδίων κατά τη γήρανση. Ένας τέτοιος μηχανισμός έχει πρόσφατα αναφερθεί στο ήπαρ γηρασμένων αρουραίων (Shenvi et al., 2012).

Δεδομένων των παραπάνω ευρημάτων μας, προτείνουμε το εξής μοντέλο (Εικ. 5.1). Οι γονάδες από νεαρά άτομα διαθέτουν υψηλότερα επίπεδα (~2 φορές παραπάνω) έκφρασης και ενζυμικής ενεργότητας του πρωτεασώματος σε σύγκριση με τους σωματικούς ιστούς, τα οποία, καθώς και η λειτουργικότητα του μονοπατιού σηματοδότησης Nrf2 (CncC)/Keap1 παραμένουν σχετικά σταθερά κατά τη γήρανση. Αντίθετα, στους γηρασμένους σωματικούς ιστούς παρατηρείται πτώση της πρωτεασωμικής έκφρασης και λειτουργίας, καθώς και δυσλειτουργία του μονοπατιού σηματοδότησης Nrf2 (CncC)/Keap1. Επίσης, η δυσλειτουργία του μονοπατιού σηματοδότησης Nrf2 (CncC)/Keap1 στο γηρασμένο σώμα, σε αντίθεση με τους σωματικούς ιστούς από νεαρά άτομα, καθώς και τις γονάδες (ανεξαρτήτως ηλικίας), έχει ως αποτέλεσμα τη μη αποτελεσματική ενεργοποίηση των AREs (είτε υπό φυσιολογικές συνθήκες είτε υπό παρουσία στρες) που οδηγούν στη μειωμένη έκφραση και λειτουργικότητα του πρωτεασώματος, καθώς και σε περαιτέρω συσσώρευση στρεσογόνων παραγόντων.



Εικόνα 5.1 Προτεινόμενο μοντέλο της διαφορικής έκφρασης και λειτουργίας του πρωτεασώματος, καθώς και της κυτταρικής αντιοξειδωτικής απόκρισης κατά την *in vivo* γήρανση στους σωματικούς ιστούς και στις γονάδες της *Drosophila*. (A) Η σχετική ενδογενής έκφραση και ενεργότητα του πρωτεασώματος είναι κατά ~2 φορές υψηλότερη στις γονάδες σε σύγκριση με τους σωματικούς ιστούς και, μαζί με τη λειτουργία της αντιοξειδωτικής απόκρισης του κυττάρου (μονοπάτι σηματοδότησης Nrf2(CncC)/Keap1), παραμένουν σχετικά σταθερά κατά τη γήρανση. Αντίθετα, στους σωματικούς ιστούς παρατηρείται πτώση (σε σύγκριση με τους σωματικούς ιστούς από νεαρά άτομα) της πρωτεασωματικής έκφρασης και λειτουργίας, καθώς και δυσλειτουργία του μονοπατιού σηματοδότησης Nrf2 (CncC)/Keap1 κατά τη γήρανση. (B) Η δυσλειτουργία του μονοπατιού σηματοδότησης Nrf2 (CncC)/Keap1 στο γηρασμένο σώμα [σε αντίθεση με τους σωματικούς ιστούς από νεαρά άτομα, καθώς και τις γονάδες (ανεξαρτήτως ηλικίας)] επιφέρει την μη αποτελεσματική ενεργοποίηση των AREs, είτε υπό φυσιολογικές συνθήκες είτε παρουσία στρες. Τελικά παρατηρείται μειωμένη έκφραση και λειτουργικότητα του πρωτεασώματος, καθώς και συσσώρευση στρες.

Προκειμένου να διερευνηθούν οι επιδράσεις από τη διαταραχή της πρωτεόστασης κατά την *in vivo* γήρανση, χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία RNAi, προκειμένου με γενετικό τρόπο να δημιουργηθούν έντομα, τα οποία θα είχαν μειωμένη έκφραση των πρωτεασωμακών υπομονάδων β5 ή α7. Παρατηρήθηκε ότι η καταστολή έκφρασης των β5 και α7 υπομονάδων οδηγεί σε μείωση της πρωτεασωματικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης στο στάδιο της λάρβας• σε

ανώμαλη ανάπτυξη της λάρβας που συνδυάζεται με έντονα μειωμένη κινητικότητα και τελικά στο θάνατο στο 2^ο-3^ο αναπτυξιακό στάδιο. Στη συνέχεια, το ερώτημα του κατά πόσον η πρωτεασωμική δυσλειτουργία επιδρά στο ρυθμό εξέλιξης του γήρατος προσεγγίστηκε με την ανάπτυξη ενός φαρμακολογικού μοντέλου μερικής αναστολής της πρωτεασωμικής λειτουργίας. Το φαρμακολογικό αυτό μοντέλο υπερέχει της γενετικής προσέγγισης, καθώς η δομή των πρωτεασωμάτων διατηρείται ακέραια και επηρεάζεται μόνο η ενζυμική ενεργότητα του συμπλόκου, όπως ακριβώς συμβαίνει κατά το φυσιολογικό γήρας. Σημειώνουμε ότι σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες η έλλειψη των υπομονάδων β2 ή β6 διαταράσσει την αυτοσυγκρότηση του πρωτεασώματος (Covi et al., 1999).

Στα πλαίσια αυτής της πειραματικής προσέγγισης χορηγήθηκε στα έντομα (μέσω της τροφής) σειρά ειδικών αναστολέων του πρωτεασώματος. Οι μελέτες μας έδειξαν ότι η μείωση της ενεργότητας του πρωτεασώματος στα νεαρά έντομα στα επίπεδα που παρατηρούνται στα γηρασμένα άτομα προκαλεί σημαντική διαταραχή της πρωτεόστασης, μειωμένη μυϊκή δύναμη των εντόμων, συσσώρευση των AGEs [που έχουν προταθεί και ως βιοδείκτης γήρανσης στη *Drosophila*, (Jacobson et al., 2010)] και τελικά δοσο- εξαρτώμενη μείωση του προσδόκιμου ζωής. Η σημαντική μείωση του προσδόκιμου ζωής, όταν στα νεαρά έντομα επιτεύχθηκαν επίπεδα ενζυμικής πρωτεασωμικής ενεργότητας όμοια με αυτά που παρατηρήθηκαν στα γηρασμένα άτομα, δεικνύει ότι τα επίπεδα της ενεργότητας του πρωτεασώματος που παρατηρούνται στα γηρασμένα έντομα είναι ασύμβατα με τη ζωή. Επίσης, τα στάδια ανάπτυξης, μετά την εκκόλαψη του ωοθυλακίου, βρέθηκαν να είναι πολύ ευαίσθητα στη μερική αναστολή της πρωτεασωμικής ενεργότητας (σε σύγκριση με τα στάδια της γαμετογένεσης ή τα ενήλικα έντομα). Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με τα ευρήματα των πειραμάτων γενετικής, τόσο τα δικά μας όσο και άλλων μελετών (Covi et al., 1999; Szlanka et al., 2003; Tonoki et al., 2009). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει επίσης η παρατήρηση ότι σε μικρές συγκεντρώσεις αναστολέα του πρωτεασώματος (ήπια πρωτεωμική αστάθεια) τα έντομα, αν και τελικά εκκολάπτονταν, εμφάνισαν μείωση στο προσδόκιμο ζωής τους. Η παρατήρηση αυτή δεικνύει ότι πρωτεωμική αστάθεια στα πρώιμα στάδια της ζωής (π.χ. κατά την ανάπτυξη) επιδρά σημαντικά στην περαιτέρω υγεία και μακροβιότητα του οργανισμού. Συμφωνεί επίσης με πρόσφατες μελέτες που δείχνουν ότι οι αυξημένες βλάβες στο DNA κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής των θηλαστικών επηρεάζει σημαντικά τη νοσηρότητα και γενικά την μακροβιότητα του ενήλικου ατόμου (Murga et al., 2009).

Σύμφωνα με τα ευρήματα της παρούσας ΔΔ, η παροδική μερική αναστολή της πρωτεασωμικής ενζυμικής ενεργότητας σε νεαρά έντομα οδήγησε στη δοσο- εξαρτώμενη επαγωγή της γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεασωμική υπομονάδων που συνοδεύεται με αύξηση των αυτοσυγκροτημένων πρωτεασωμάτων. Το παραπάνω εύρημα είναι σε συμφωνία με προηγούμενες *in vitro* μελέτες που έδειξαν την υπερέκφραση των πρωτεασωμικών γονιδίων μετά από αναστολή της πρωτεασωμικής ενεργότητας σε

ανθρώπινα κύτταρα, καθώς και σε κύτταρα *Drosophila* (Lundgren et al., 2005; Zhu et al., 2011).

Μια ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα παρατήρησή μας αφορά στο εύρημα ότι η επαγωγή της έκφρασης του πρωτεασώματος δεν παρατηρήθηκε σε γηρασμένους σωματικούς ιστούς που εμφάνισαν δυσλειτουργία του πρωτεασώματος. Ακόμη, βρέθηκε ότι η δυσλειτουργία του πρωτεασώματος οδηγεί σε αύξηση του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου (ROS) και των επιπέδων H_2O_2 μόνο στα νεαρούς και όχι στους γηρασμένους σωματικούς ιστούς. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα των κυτταρικών ROS φαίνεται να σηματοδοτούν την πρωτεασωμική δυσλειτουργία και να διαμεσολαβούν την επαγωγή της έκφρασης των πρωτεασωμικών γονιδίων. Δεδομένου ότι η κύρια πηγή παραγωγής των ROS είναι τα μιτοχόνδρια, ελέγχθηκε αν η δυσλειτουργία του πρωτεασώματος επηρεάζει την ομοιοστασία των μιτοχονδρίων (μιτόσταση). Μετά από ανάλυση απομονωμένων μιτοχονδρίων από έντομα που εκτέθηκαν στον πρωτεασωμικό αναστολέα, διαπιστώθηκε διαταραχή της μιτόστασης (αύξηση των οξειδωμένων και ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών), καθώς και δυσλειτουργία της ηλεκτρονικής αφυδρογονάσης και του συμπλέγματος II/III. Οι παρατηρήσεις αυτές συνάδουν με την παρατηρούμενη αύξηση των ROS. Αν και μέχρι τώρα δεν έχει αναφερθεί ότι η πρωτεασωμική δυσλειτουργία μπορεί να επηρεάζει τη μιτόσταση, σχετικά πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι μη λειτουργικές μιτοχονδριακές πρωτεΐνες οδηγούνται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη για αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα (Torres και Perez, 2008; Taylor και Rutter, 2011). Επίσης, έχειδειχθεί (χωρίς να έχει εξηγηθεί ο μηχανισμός) από προηγούμενη μελέτη ότι η αναστολή του πρωτεασώματος οδηγεί σε αύξηση των ROS από τα μιτοχόνδρια (Weniger et al., 2011). Επίσης, οι μελέτες μας είναι σε συμφωνία με προηγούμενες εργασίες που δείχνουν τη μείωση της λειτουργικότητας των μιτοχονδρίων κατά τη γήρανση τόσο σε ασπόνδυλα όσο και σε σπονδυλωτά (Ferguson et al., 2005). Ειδικότερα, παρατηρήθηκε ότι η «ικανότητα» των μιτοχονδρίων να σηματοδοτούν την πρωτεασωμική δυσλειτουργία απαλείφεται στους γηρασμένους σωματικούς ιστούς.

Με τη χρήση σειράς διαγονιδιακών εντόμων διαπιστώθηκε στα πλαίσια της παρούσας ΔΔ ότι η παροδική πρωτεασωμική δυσλειτουργία ενεργοποιεί την αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου στους σωματικούς ιστούς των νεαρών (αλλά όχι των γηρασμένων) εντόμων, καθώς και στις γονάδες ανεξαρτήτως ηλικίας. Επομένως, φαίνεται να υπάρχει δυσλειτουργία του μηχανισμού αντιοξειδωτικής απόκρισης (και γενικότερα κυτταρικής «απάντησης» στο στρες) κατά τη γήρανση των σωματικών ιστών. Τα ευρήματα αυτά συνάδουν με την πρόσφατη εργασία των Rahman et al. (2013) που αναφέρει μείωση της λειτουργικότητας των μηχανισμών αντιοξειδωτικής απόκρισης σε γηρασμένα έντομα. Καθώς το κύριο μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης είναι το σηματοδοτικό μονοπάτι Nrf2/Keap1 (Sykiotis και Bohmann, 2010), ελέγχθηκε στα πλαίσια της παρούσας ΔΔ αν η ενεργοποίηση του Nrf2 σχετίζεται με την επαγωγή του πρωτεασώματος κατά την *in vivo* πρωτεασωμική

δυσλειτουργία. Οι μελέτες μας έδειξαν ότι η επαγωγή των πρωτεασωμικών γονιδίων μετά από μερική αναστολή του πρωτεασώματος σε νεαρά έντομα διαμεσολαβείται από τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 (CncC). Ακόμη, η παροδική υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα CncC σε νεαρά αλλά και σε γηρασμένα έντομα οδήγησε στην αύξηση της έκφρασης και ενζυμικής ενεργότητας του πρωτεασώματος, καθώς και σε αυξημένη ανθεκτικότητα παρουσία παροδικού πρωτεοτοξικού στρες. Το εύρημα ότι η υπερέκφραση του CncC οδήγησε στην ενεργοποίηση της πρωτεασωμικής έκφρασης και τελικά της ενζυμικής ενεργότητας τόσο στα νεαρά όσο και στα γηρασμένα έντομα δεικνύει πως δεν υφίστανται επιπλέον ρυθμιστικά στάδια ανάμεσα στην επαγωγή των πρωτεασωμικών γονιδίων και στην αυτοσυγκρότηση πλήρως λειτουργικών πρωτεασωμάτων. Επίσης, οι μελέτες μας έδειξαν για πρώτη φορά πως δεν υπάρχει κάποια ηλικιο- εξαρτώμενη μεταβολή στη χρωματίνη που να παρεμποδίζει την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα CncC, προκειμένου αυτός να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή των πρωτεασωμικών γονιδίων στο γηρασμένο σωματικό ιστό. Ο προστατευτικός ρόλος του Nrf2 έναντι του οξειδωτικού στρες έχειδειχθεί και από προηγούμενες (σχετικά πρόσφατες) μελέτες, όπου βρέθηκε ότι παρέχει προστασία παρουσία οξειδωτικού στρες (Sykietis και Bohmann, 2008). Επιπλέον, η έλλειψη του Nrf2 γονιδίου στον μυϊκό ιστό οδήγησε σε μειωμένη ανθεκτικότητα σε σειρά οξειδωτικών παραγόντων αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις (Ramos-Gomez et al., 2001; Hubbs et al., 2007). Επίσης, σύμφωνα με μια πρόσφατη *in vitro* μελέτη, ο Nrf2 βρέθηκε να ρυθμίζει την έκφραση των πρωτεασωμικών γονιδίων (Grimberg et al., 2011), ενώ σύμφωνα με μια άλλη εργασία, η επαγωγή του πρωτεασώματος και του ρυθμιστικού μορίου Pa28αβ που διαμεσολαβείται μέσω του Nrf2 είναι απαραίτητη για την προσαρμογή των ανθρώπινων κυττάρων στο οξειδωτικό στρες (Pickering et al., 2012b).

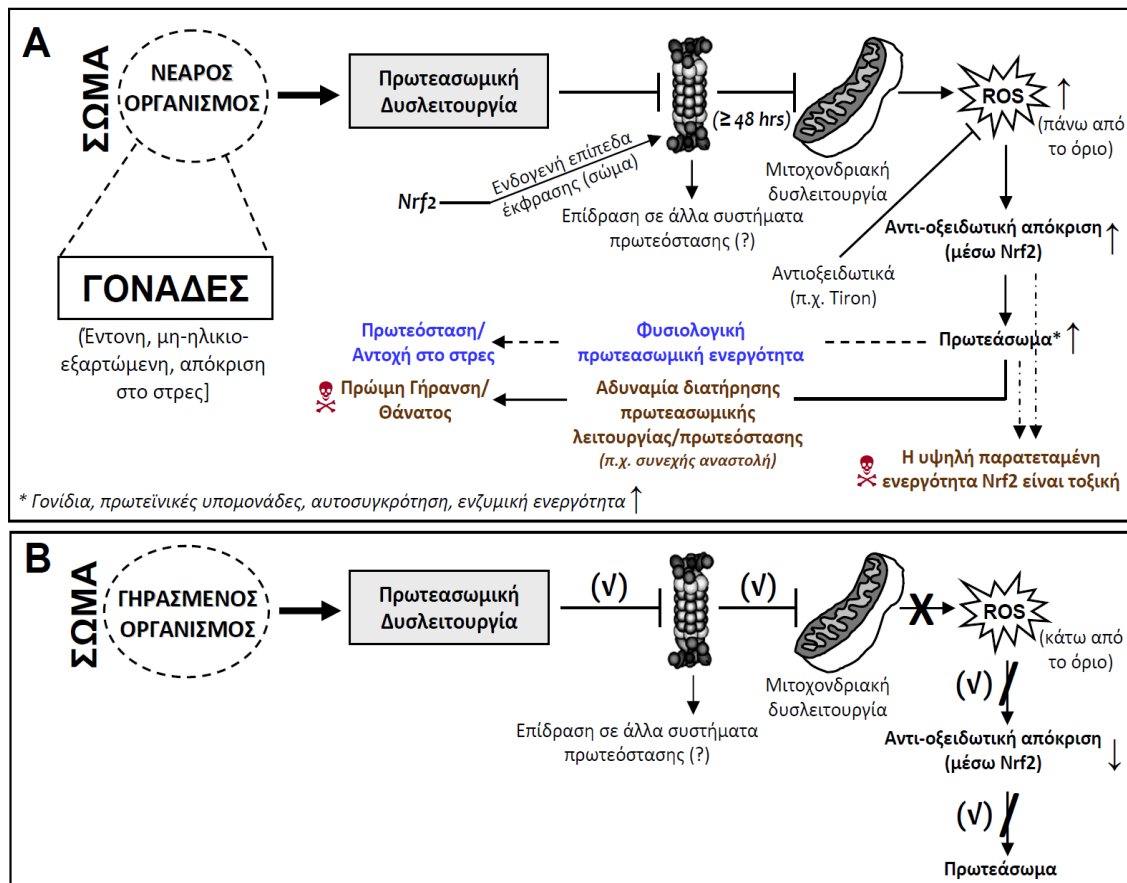
Η *in vivo* RNAi-επαγόμενη καταστολή έκφρασης του Nrf2 προκαλεί έντονη μείωση της μακροβιότητας, ενώ ένα σημαντικό (μη αναμενόμενο εύρημα) της παρούσας ΔΔ είναι ότι η μακροχρόνια ενεργοποίηση του Nrf2 είναι τοξική για τον οργανισμό, αφού οδηγεί σε σημαντική μείωση του προσδόκιμου ζωής. Τα ευρήματα αυτά δεικνύουν ότι η μακροχρόνια διαταραχή της έντασης ή της διάρκειας της αντιοξειδωτικής απόκρισης είναι επιβλαβής για τον οργανισμό. Το παραπάνω εύρημα συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες που αναφέρουν ότι η έλλειψη και των δύο αλληλίων του γονιδίου *keap1* (ενεργοποίηση του ενδογενούς CncC; Sykietis και Bohman, 2008) ή του *cncC* (Veraksa et al., 2000) προκαλεί θάνατο στο στάδιο της λάρβας 2^{ου} σταδίου. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε μελέτη στο *Caenorhabditis elegans*, όπου η υπερέκφραση του SKN-1 (το ομόλογου του Nrf2 στο *Caenorhabditis elegans*) βρέθηκε να έχει θνησιγόνο αποτέλεσμα (Tullet et al., 2008). Σε αντίθεση με τα παραπάνω, η υπερέκφραση της πρωτεασωμικής ρυθμιστικής υπομονάδας Rpn11 οδήγησε σε ήπια αύξηση (30%) της 26S πρωτεασωμικής ενεργότητας και προκάλεσε αύξηση της μακροβιότητας των εντόμων (Tonoki et al., 2009), ενώ αρσενικά ετερόζυγα

έντομα που είχαν κατασταλμένη την πρωτεΐνη Keap1 (στα έντομα αυτά επάγεται ήπια ενεργοποίηση του ενδογενούς Nrf2) είχαν αυξημένη μακροβιότητα σε σχέση με τα έντομα μάρτυρες (Sykietis και Bohmann, 2008). Επομένως, φαίνεται πως μόνο η ήπια ενεργοποίηση των συστημάτων διατήρησης της πρωτεόστασης είναι ωφέλιμη για τον οργανισμό.

Η διαπίστωση αυτή σε συνδυασμό με πρόσφατες παρατηρήσεις που δείχνουν ότι κάποιοι τύποι καρκίνου εμφανίζουν αυξημένη ενεργοποίηση του Nrf2 και/ή του πρωτεασώματος (Ruschak et al., 2011; Sporn και Liby, 2012) σημαίνει ότι θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στη μη ρυθμιζόμενη ενεργοποίηση των δύο αυτών μονοπατιών από (για παράδειγμα) φυσικά προϊόντα που αποτελούν συστατικά καλλυντικών ή φαρμακευτικών σκευασμάτων.

Συμπερασματικά, όπως περιγράφεται και στην Εικ. 5.2, η πρωτεασωμική δυσλειτουργία στους σωματικούς ιστούς από νεαρά άτομα, καθώς και στις γονάδες (ανεξαρτήτως ηλικίας), προκαλεί τη διαταραχή της μιτόστασης, με αποτέλεσμα την παραγωγή ROS, τα οποία ενεργοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2/CncC. Ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας με τη σειρά του επάγει την έκφραση των πρωτεασωμικών υπομονάδων, προκειμένου να αποκατασταθεί η πρωτεόσταση. Όταν η πρωτεασωμική δυσλειτουργία είναι παρατεταμένη, τότε ο οργανισμός αποτυγχάνει να επανακτήσει τα φυσιολογικά επίπεδα πρωτεόστασης, με αποτέλεσμα να προκαλείται πρόωμη γήρανση και τελικά θάνατος, πιθανώς λόγω της παρατεταμένης και έντονης ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού Nrf2(CncC)/Keap1 (που βρέθηκε να είναι τοξική), καθώς και λόγω της σημαντικής συσσώρευσης βλάβης στα βιομόρια του κυττάρου. Αντίθετα, η πρωτεασωμική δυσλειτουργία στους σωματικούς ιστούς από γηρασμένα άτομα δεν καταλήγει στην υπερέκφραση των πρωτεασωμικών υπομονάδων, πιθανώς λόγω της βλάβης των μιτοχονδρίων από το γήρας, που τα καθιστά μη ικανά να παράγουν επαρκή επίπεδα ROS, ώστε να σηματοδοτήσουν τη βλάβη του πρωτεασώματος και/ή εξαιτίας της δυσλειτουργικότητας του μονοπατιού σηματοδότησης Nrf2(CncC)/Keap1. Επομένως, ο γηρασμένος σωματικός ιστός αναμένεται να είναι εξαιρετικά ευαίσθητος (σε σύγκριση με τους σωματικούς ιστούς από νεαρά άτομα) στο στρες.

Δεδομένων των ευρημάτων της παρούσας ΔΔ σχετικά με τη σημαντικότητα του πρωτεασώματος στη φυσιολογία του οργανισμού και την εξέλιξη του γήρατος στη συνέχεια μελετήθηκε η φυσιολογία διαγονιδιακών εντόμων, στα οποία είχε προκληθεί RNAi-επαγόμενη καταστολή της έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων β1, β5, α4, α7, Rpn11, Rpn6, Rpn10 και Rpt6. Η μελέτη αυτή αποσκοπεί στο να χαρτογραφηθεί, για πρώτη φορά, η «βαρύτητα» των διαφόρων πρωτεασωμικών υπομονάδων στην *in vivo* αυτοσυγκρότηση και τελικά στη λειτουργία του πρωτεασώματος, καθώς και στη φυσιολογία και μακροβιότητα του οργανισμού.



Εικόνα 5.2 Προτεινόμενο μοντέλο του ρυθμιστικού συστήματος ανατροφοδότησης της λειτουργίας του πρωτεασώματος μετά από πρωτεασωμική δυσλειτουργία. (A) Η πρωτεασωμική δυσλειτουργία στους σωματικούς ιστούς από νεαρά άτομα *Drosophila* και στις γονάδες (ανεξαρτήτως ηλικίας) προκαλεί (μετά από ~48 ώρες μειωμένης πρωτεασωμικής λειτουργίας) τη διαταραχή της μιτόστασης και την έντονη παραγωγή ROS. Το παραγόμενο οξειδωτικό στρες (ROS) ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι Nrf2 (CncC)/Kear1, το οποίο με τη σειρά του επάγει την έκφραση των πρωτεασωμικών υπομονάδων, προκειμένου η πρωτεασωμική λειτουργία να επανέλθει σε φυσιολογικά επίπεδα. Στην περίπτωση παρατεταμένης πρωτεασωμικής δυσλειτουργίας, ο οργανισμός αποτυγχάνει να επαναφέρει την πρωτεόσταση, με αποτέλεσμα το θάνατο, πιθανώς λόγω της παρατεταμένης και έντονης ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού Nrf2(CncC)/Kear1 (η οποία είναι τοξική), καθώς και λόγω της συσσώρευσης βλάβης στα βιομόρια του κυττάρου. (B) Η πρωτεασωμική δυσλειτουργία στους σωματικούς ιστούς από γηρασμένα άτομα δεν καταλήγει στην υπερέκφραση των πρωτεασωμικών υπομονάδων και την επαναφορά της πρωτεόστασης. Φαίνεται ότι, η πρωτεασωμική δυσλειτουργία, πιθανώς λόγω της σχετιζόμενης με το γήρας υπολειτουργίας των μιτοχονδρίων δεν επαρκεί για να προκληθεί επαρκής αύξηση των ROS από τα μιτοχόνδρια, ώστε να σηματοδοτηθεί στον γηρασμένο ιστό η μειωμένη πρωτεασωμική λειτουργικότητα. Επομένως, ο γηρασμένος σωματικός ιστός (σε σύγκριση με τους σωματικούς ιστούς από νεαρά άτομα) είναι εξαιρετικά πιο ευαίσθητος παρουσία στρες.

Το εύρημά μας ότι η RNAi-επαγόμενη μείωση της έκφρασης των υπομονάδων β5, α7, Rpn11 και Rpn6 προκαλεί θνησιμότητα στο στάδιο της λάρβας και/ή της προνύμφης, καθώς και ότι η RNAi-επαγόμενη καταστολή της έκφρασης μιας πρωτεασωμικής υπομονάδας προκαλεί επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης των υπολοίπων πρωτεασωμικών υπομονάδων επιβεβαιώνει (phenocopies) με γενετικό τρόπο τον φαινότυπο που παρατηρήθηκε μετά από

επίδραση σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια με τον πρωτεασωμικό αναστολέα PS-341. Είναι επίσης σε συμφωνία με άλλες μελέτες που αναφέρουν ότι η υπερέκφραση, μεταλλαγμένων (μη λειτουργικών) πρωτεασωμικών υπομονάδων β2 και β6 προκαλεί πρώιμο θάνατο στο στάδιο της λάρβας και της προνύμφης, αντίστοιχα (Covi et al., 1999). Παρόμοια αποτελέσματα επίσης παρατηρήθηκαν μετά από μείωση της έκφρασης της Rpn11 ρυθμιστικής πρωτεασωμικής υπομονάδας (Tonoki et al., 2009), ενώ σε μια συμπληρωματική προσέγγιση η υπερέκφραση των Rpn11 και Rpn6 πρωτεασωμικών υπομονάδων επέφερε αύξηση του προσδόκιμου ζωής στη *Drosophila* (Tonoki et al., 2009; Vilchez et al., 2012a).

Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει το εύρημα ότι η καταστολή των υπομονάδων α4, β1, Rpn10 και Rpt6 επιτρέπουν την εκκόλαψη του ενήλικου εντόμου, αν και, όταν τα ενήλικα έντομα μεταφέρθηκαν σε συνθήκες επαγωγίσιμης έκφρασης του RNAi διαγονιδίου (μέσω της ορμόνης RU486) εμφάνισαν μείωση του προσδόκιμου ζωής με τον εντονότερο φαινότυπο να αφορά στην καταστολή της πρωτεασωμικής υπομονάδας Rpt6. Το αποτέλεσμα αυτό δεικνύει είτε ότι η απουσία των υπομονάδων αυτών επιτρέπει τη συντήρηση της πρωτεασωμικής λειτουργίας είτε ότι η απουσία τους εξισορροπείται από άλλες πρωτεασωμικές υπομονάδες. Για παράδειγμα, η παρατήρηση ότι η καταστολή της α4 υπομονάδας δε φαίνεται να προκαλεί ραγδαία αύξηση της θνησιμότητας πιθανώς εξηγείται από το εύρημα ότι η α4 και η α3 υπομονάδες φαίνεται να έχουν παρόμοια και/ή συμπληρωματική λειτουργία (Velichutina et al., 2004). Παρόλα αυτά η δομή των πρωτεασωμάτων απουσία των παραπάνω πρωτεασωμικών υπομονάδων παραμένει άγνωστη.

Όπως έδειξαν οι μελέτες μας, η *in vivo* γήρανση στη *Drosophila* συνδεεται με σημαντική αύξηση της πρωτεωμικής αστάθειας που σε μεγάλο βαθμό σχετίζεται με τη συσσώρευση οξειδωμένων πρωτεϊνών ή πρωτεϊνών τροποποιημένων με AGEs. Παρόλα αυτά η *in vivo* επιδράση των μη ενζυματικά τροποποιημένων πρωτεϊνών με AGEs, καθώς και της λιποφουσκίνης, (πρωτεϊνικών τροποποιήσεων) που συσσωρεύονται κατά τη γήρανση) στη φυσιολογία του οργανισμού παρέμεναν σε μεγάλο βαθμό άγνωστες. Είναι σημαντικό επίσης να αναφερθεί ότι η διατροφή ειδικά στις δυτικές χώρες είναι αρκετά περιεκτική σε AGEs, τα οποία (όπως έχει δειχθεί σε προηγούμενες μελέτες) σε μεγάλες συγκεντρώσεις φαίνεται να συμβάλλουν στην αύξηση του οξειδωτικού στρες και/ή σε φλεγμονώδεις καταστάσεις (Uribarri et al., 2010). Επίσης, τα AGEs φαίνεται να αυξάνονται στους γηρασμένους ιστούς (Jacobson et al., 2010), ενώ τόσο η *in vivo* όσο και η κυτταρική γήρανση συνοδεύονται από ενδοκυτταρική συσσώρευση της λιποφουσκίνης (κυρίως στα λυσοσώματα) (Sitte et al., 2001; Hohn et al., 2012). Επίσης έχει βρεθεί σε *in vitro* κυτταρικά συστήματα ότι η λιποφουσκίνη μπορεί και αναστέλλει το πρωτεάσωμα (Jung et al., 2007; Sitte et al., 2000). Δεδομένων των ευρημάτων αυτών και έχοντας ως στόχο να μελετήσουμε την επίδραση των διατροφικών AGEs ή της λιποφουσκίνης στη φυσιολογία του οργανισμού, εκθέσαμε νεαρά έντομα *Drosophila* σε διατροφή πλούσια στις παραπάνω πρωτεϊνικές τροποποιήσεις. Τα ευρήματά

μας έδειξαν ότι η κατανάλωση τροφής πλούσια σε AGEs ή λιποφουσκίνη προκαλεί διαταραχή της πρωτεόστασης και δυσλειτουργία του πρωτεασώματος, καθώς και αύξηση του οξειδωτικού στρες. Επίσης, το εύρημα της αύξησης της πρωτεασωματικής έκφρασης είναι σε συμφωνία με τα προηγούμενα μας ευρήματα που έδειξαν ότι η δυσλειτουργία του πρωτεασώματος (π.χ. παρουσία PS-341) επάγει την υπερέκφραση των πρωτεασωματικών υπομονάδων.

Σε προηγούμενες μελέτες σε θηλαστικά έχει δειχθεί ότι η αύξηση του οξειδωτικού στρες λόγω έκθεσης σε AGEs σχετίζεται με τη σύνδεσή τους στον υποδοχέα των AGEs που ονομάζεται RAGE (Receptor of AGEs) (Yamagishi et al., 2002; Bansal et al., 2012), καθώς και στη συμμετοχή της αναπνευστικής αλυσίδας του μιτοχονδρίου, αλλά και της NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) οξειδάσης (Wautier et al., 2001; Coughlan et al., 2009). Αν και στη *Drosophila* οι μηχανισμοί αυτοί παραμένουν υπό διερεύνηση, η παρατήρηση της αύξησης των AGEs στην αιμολέμφο των εντόμων που εκτέθηκαν σε τροφή πλούσια σε AGEs δείχνει ότι πιθανότατα τα AGEs απορροφούνται από το γαστρεντερικό σύστημα. Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη που ανέφερε αύξηση των ενδογενών επιπεδων AGEs σε υγιείς ανθρώπους, που κατανάλωσαν δίαιτα υψηλού περιεχομένου σε AGEs (Uribarri et al., 2005). Επίσης, δίαιτα χαμηλού περιεχομένου γλυκοτοξινών σε ποντίκια οδήγησε σε μείωση του οξειδωτικού στρες και αύξηση του χρόνου ζωής (Cai et al., 2007), ενώ η χορήγηση ενός αναλόγου των AGEs (methyl-glyoxal-BSA) σε ποντίκια αύξησε τα επίπεδα των AGEs στον ορό και προκάλεσε αύξηση του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου (Cai et al., 2008).

Τα λυσοσώματα (η λειτουργία των οποίων εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από τα ένζυμα των καθεψινών) είναι κομβικά οργανίδια για την κυτταρική πρωτεόλυση και τη διατήρηση της πρωτεόστασης μέσω αυτοφαγίας, καθώς και για την ανακύκλωση μη λειτουργικών οργανιδίων (π.χ. μιτοχονδρίων) (Futerman et al., 2004; Pallauf et al., 2013). Η αύξηση της ενεργότητας των καθεψινών που παρατηρήθηκε στα έντομα που κατανάλωναν τροφή πλούσια σε AGEs ή σε λιποφουσκίνη είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες σε *in vitro* κυτταρικά συστήματα που έδειξαν πως η καθεψίνη D είναι ένα από τα ένζυμα που συμμετέχει ενεργά στην ενδοκυτταρική αποικοδόμηση πρωτεϊνών που έχουν τροποποιηθεί με AGEs (Grimm et al., 2010), καθώς και ότι η ενεργότητα των καθεψινών D και L μειώνει τη τοξικότητα των AGEs (Grimm et al., 2012). Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει το εύρημα ότι το 20S πρωτεάσωμα δε δύναται να αποικοδομήσει AGEs (Grimm et al., 2010). Ο σημαντικός ρόλος της καθεψίνης D στην απομάκρυνση τροποποιημένων πρωτεϊνών έχει επιπλέον δειχθεί τόσο στη *Drosophila* όσο και στον ποντικό, όπου η απουσία του συγκεκριμένου ενζύμου συσχετίστηκε με νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Shacka et al., 2007; Khurana et al., 2010). Συμπερασματικά, μια δίαιτα πλούσια σε AGEs ή λιποφουσκίνη συμβάλλει στην εμφάνιση πρόωμης γήρανσης και ως εκ τούτου η περιορισμένη κατανάλωση

τροφών πλούσιων σε τέτοιου είδους πρωτεϊνικές τροποποιήσεις (βλέπε, Εισαγωγή) μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του προσδόκιμου ζωής ή σε επιβράδυνση της εμφάνισης των ασθενειών του γήρατος.

Συνοπτικά, τα ευρήματα της παρούσας ΔΔ υποστηρίζουν ότι:

- Η ηλικιο- και ιστο- εξαρτώμενη ρύθμιση του πρωτεασώματος συμμετέχει στην εξέλιξη της γήρανσης.
- Η έκφραση των πρωτεασωματικών γονιδίων μειώνεται κατά τη γήρανση κυρίως στους σωματικούς ιστούς.
- Η μείωση της έκφρασης του πρωτεασώματος κατά τη γήρανση σχετίζεται με τη δυσλειτουργία του μονοπατιού σηματοδότησης Nrf2/ Kead1.
- Η διαταραχή της πρωτεασωματικής λειτουργίας στους νεαρούς σωματικούς ιστούς, καθώς και στις γονάδες ανεξαρτήτως ηλικίας κινητοποιεί ένα δίκτυο σηματοδότησης, το οποίο μέσω αυξημένης παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου από τα μιτοχόνδρια ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2, ο οποίος στη συνέχεια επάγει την υπερέκφραση πρωτεασωματικών γονιδίων, προκειμένου να αποκατασταθεί η πρωτεασωματική λειτουργία και ενεργότητα.
- Στους γηρασμένους σωματικούς ιστούς τα σηματοδοτικά δίκτυα απόκρισης στο στρες υπολειτουργούν σε σημαντικό βαθμό.
- Η παρατεταμένη διαταραχή της έντασης ή της διάρκειας της αντιοξειδωτικής απόκρισης είναι τοξική για τον οργανισμό.
- Οι πρωτεασωματικές υπομονάδες φαίνεται να έχουν διαφορετική βαρύτητα στην αυτοσυγκρότηση του πρωτεασώματος, την πρωτεασωματική λειτουργία και τελικά, στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιοστασίας.
- Τόσο πρωτεΐνες τροποποιημένες με AGEs όσο και η λιποφουσκίνη συμβάλλουν στην εμφάνιση πρώιμης γήρανσης.
- Σημαντικό ρόλο στην εξάλειψη της τοξικότητας πρωτεϊνών τροποποιημένων με AGEs η της λιποφουσκίνης παίζουν οι λυσοσωμικές καθεψίνες.

Επίσης, τα αποτελέσματα της παρούσας ΔΔ παρέχουν πειραματική υποστήριξη στην εξελικτική θεωρία σχετικά με το γήρας που ονομάζεται «**Θεωρία του Φθαρτού Σώματος**», σύμφωνα με την οποία το «φθαρτό» σώμα είναι απαραίτητο μόνο για να συντηρεί το αναπαραγωγικό σύστημα, το οποίο γηράσκει με σχετικά αργούς ρυθμούς.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams, R.L.P., 1980. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: Cell culture for biochemists. Elsevier Science, Amsterdam.
- Aebi, M., Bernasconi, R., Clerc, S., Molinari, M., 2010. N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem Sci.* 35, 74-82.
- Alic, N., Partridge, L., 2011. Death and dessert: nutrient signalling pathways and ageing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 738-43.
- Amerik, A.Y., Hochstrasser M., 2004. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1695, 189-207.
- Anderson, R.M., Bitterman, K.J., Wood J.G., Medvedik, O., Sinclair, D.A., 2003. Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 423, 181.
- Arendt, C.S., Hochstrasser, M., 1997. Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94, 7156-61.
- Argyropoulou, A., Aligiannis, N., Trougakos, I.P., Skaltsounis, A.L., 2013. Natural compounds with anti-ageing activity. *Nat. Prod. Rep.* 2013 Sep 3. [Epub ahead of print]
- Arnold, I., Langer, T., 2002. Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1592, 89-96.
- Assar, S.H., Moloney, C., Lima, M., Magee, R., Ames, J.M., 2009. Determination of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine in food systems by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Amino Acids.* 36, 317-26.
- Avezov, E., Frenkel, Z., Ehrlich, M., Herscovics, A., Lederkremer, G.Z., 2008. Endoplasmic reticulum (ER) mannosidase I is compartmentalized and required for N-glycan trimming to Man5-6GlcNAc2 in glycoprotein ER-associated degradation. *Mol. Biol. Cell* 19, 216-25.
- Azad, N., Vallyathan, V., Wang, L., Tantishaiyakul, V., Stehlik, C., Leonard, S.S., Rojanasakul, Y., 2006. S-nitrosylation of Bcl-2 inhibits its ubiquitin-proteasomal degradation. A novel antiapoptotic mechanism that suppresses apoptosis. *J. Biol. Chem.* 281, 34124-34.
- Baboshina, O.V., Haas, A.L., 1996. Novel multiubiquitin chain linkages catalyzed by the conjugating enzymes E2EPF and RAD6 are recognized by 26 S proteasome subunit 5. *J. Biol. Chem.* 271, 2823-31.
- Bagola, K., Mehnert, M., Jarosch, E., Sommer, T., 2011. Protein dislocation from the ER. *Biochim Biophys Acta.* 1808, 925-36.
- Bakala, H., Delaval, E., Hamelin, M., Bismuth, J., Borot-Laloi, C., Corman, B., Friguet, B., 2003. Changes in rat liver mitochondria with aging. Lon protease-like reactivity and N(epsilon)-carboxymethyllysine accumulation in the matrix. *Eur. J. Biochem.* 270, 2295-302.
- Baker, D.J., Dawlaty, M.M., Wijshake, T., Jegannathan, K.B., Malureanu, L., van Ree, J.H., Crespo-Diaz, R., Reyes, S., Seaburg, L., Shapiro, V., Behfar, A., Terzic, A., van de Sluis, B., van Deursen, J.M., 2013. Increased expression of BubR1 protects against aneuploidy and cancer and extends healthy lifespan. *Nat. Cell. Biol.* 15, 96-102.
- Baker, M.J., Tatsuta, T., Lange, T., 2011. Quality control of mitochondrial proteostasis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, (7). doi:pii: a007559. 10.1101/cshperspect.a007559.
- Bansal, S., Siddarth, M., Chawla, D., Banerjee, B.D., Madhu, S.V., Tripathi, A.K., 2012. Advanced glycation end products enhance reactive oxygen and nitrogen species generation in neutrophils *in vitro*. *Mol. Cell Biochem.* 361, 289-296.
- Balch, W.E., Morimoto, R.I., Dillin, A., Kelly, J.W., 2008. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 319, 916-9.
- Bardag-Gorce, F., Venkatesh, R., Li, J., French, B.A., French, S.W., 2004. Hyperphosphorylation of rat liver proteasome subunits: the effects of ethanol and okadaic acid are compared. *Life Sci.* 75, 585-97.
- Barton, L.F., Cruz, M., Rangwala, R., Deepe, G.S. Jr., Monaco, J.J., 2002. Regulation of immunoproteasome subunit expression *in vivo* following pathogenic fungal infection. *J. Immunol.* 169, 3046-52.
- Bays, N.W., Gardner, R.G., Seelig, L.P., Joazeiro, C.A., Hampton, R.Y., 2001. Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER-associated degradation. *Nat. Cell. Biol.* 3, 24-9.
- Behrends, C., Harper, J.W., 2011. Constructing and decoding unconventional ubiquitin chains. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 520-8.
- Belote, J.M., Miller, M., Smyth, K.A., 1998. Evolutionary conservation of a testes-specific proteasome subunit gene in *Drosophila*. *Gene* 215, 93-100.

- Benard, G., Neutzner, A., Peng, G., Wang, C., Livak, F., Youle, R.J., Karbowski, M., 2010. IBRD2, an IBR-type E3 ubiquitin ligase, is a regulatory factor for Bax and apoptosis activation. *EMBO J.* 29, 1458-71.
- Bergink, S., Jentsch, S., 2009. Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature* 458, 461-7.
- Bhoj, V.G., Chen, Z.J., 2009. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature* 458, 430-7.
- Biswas, M., Chan, J.Y., 2010. Role of Nrf1 in antioxidant response element-mediated gene expression and beyond. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 244, 16-20.
- Bordallo, J., Plemper, R.K., Finger, A., Wolf, D.H., 1998. Der3p/Hrd1p is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded luminal and integral membrane proteins. *Mol. Biol. Cell* 9, 209-22.
- Bose, S., Stratford, F.L., Broadfoot, K.I., Mason, G.G., Rivett, A.J., 2004. Phosphorylation of 20S proteasome alpha subunit C8 (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by gamma-interferon. *Biochem. J.* 378, 177-84.
- Bowe, D.B., Sadlonova, A., Toleman, C.A., Novak, Z., Hu, Y., Huang, P., Mukherjee, S., Whitsett, T., Frost, A.R., Paterson, A.J., Kudlow, J.E., 2006. O-GlcNAc integrates the proteasome and transcriptome to regulate nuclear hormone receptors. *Mol. Cell. Biol.* 26, 8539-50.
- Boyault, C., Zhang, Y., Fritah, S., Caron, C., Gilquin, B., Kwon, S.H., Garrido, C., Yao, T.P., Vourc'h, C., Matthias, P., Khochbin, S., 2007. HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates. *Genes Dev.* 21, 2172-81.
- Bryan, H.K., Olayanju, A., Goldring, C.E., Park, B.K., 2013. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem. Pharmacol.* 85, 705-717.
- Breusing, N., Arndt, J., Voss, P., Bresgen, N., Wiswedel, I., Gardemann, A., Siems, W., Grune, T., 2009. Inverse correlation of protein oxidation and proteasome activity in liver and lung. *Mech. Ageing Dev.* 130, 748-53.
- Brodsky, J.L., 2012. Cleaning up: ER-associated degradation to the rescue. *Cell* 151, 1163-7.
- Brooks, P., Fuertes, G., Murray, R.Z., Bose, S., Knecht, E., Rechsteiner, M.C., Hendil, K.B., Tanaka, K., Dyson, J., Rivett, J., 2000. Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem. J.* 346, 155-61.
- Brooks, P., Murray, R.Z., Mason, G.G., Hendil, K.B., Rivett, A.J., 2000. Association of immunoproteasomes with the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 352, 611-5.
- Buac, D., Shen, M., Schmitt, S., Kona, F.R., Deshmukh, R., Zhang, Z., Neslund-Dudas, C., Mitra, B., Dou, Q.P., 2012. From Bortezomib to Other Inhibitors of the Proteasome and Beyond. *Curr. Pharm. Des.* 19, 4025-38.
- Bulteau, A.L., Moreau, M., Saunois, A., Nizard, C., Friguet, B., 2006. Algae extract-mediated stimulation and protection of proteasome activity within human keratinocytes exposed to UVA and UVB irradiation. *Antioxid. Redox. Signal.* 8, 136-43.
- Burnert, C.R., Kennedy, B.K., 2010. Progeria syndromes and ageing: what is the connection? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 11, 567-78.
- Cai, W., Ramdas, M., Zhu, L., Chen, X., Striker, G.E., Vlassara, H., 2012. Oral advanced glycation endproducts (AGEs) promote insulin resistance and diabetes by depleting the antioxidant defenses AGE receptor-1 and sirtuin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 15888-93.
- Cai, W., He, J.C., Zhu, L., Chen, X., Wallenstein, S., Striker, G.E., Vlassara, H., 2007. Reduced oxidant stress and extended lifespan in mice exposed to a low glycotoxin diet: association with increased AGER1 expression. *Am. J. Pathol.* 170, 1893-902.
- Campisi, J., 2005. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120, 513-22.
- Carrard, G., Bulteau, A.L., Petropoulos, I., Friguet, B., 2002. Impairment of proteasome structure and function in aging. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 34, 1461-74.
- Catalgol, B., Wendt, B., Grimm, S., Breusing, N., Ozer, N.K., Grune, T., 2010. Chromatin repair after oxidative stress: role of PARP-mediated proteasome activation. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 673-80.
- Chen, P., Hochstrasser, M., 1996. Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell* 86, 961-72.
- Chondrogianni, N., Gonos, E.S., 2012. Structure and function of the ubiquitin-proteasome system: modulation of components. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 109, 41-74.
- Chondrogianni, N., Gonos, E.S., 2007. Overexpression of hUMP1/POMP proteasome accessory protein enhances proteasome-mediated antioxidant defence. *Exp. Gerontol.* 42, 899-903.
- Chondrogianni, N., Stratford, F.L., Trougakos, I.P., Friguet, B., Rivett, A.J., Gonos, E.S., 2003. Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts: induction of a senescence-

- like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation. *J. Biol. Chem.* 278, 28026-37.
- Chondrogianni, N., Trougakos, I.P., Kletsas, D., Chen, Q.M., Gonos, E.S., 2008. Partial proteasome inhibition in human fibroblasts triggers accelerated M1 senescence or M2 crisis depending on p53 and Rb status. *Aging Cell* 7, 717-32.
- Chondrogianni, N., Tzavelas, C., Pemberton, A.J., Nezis, I.P., Rivett, A.J., Gonos, E.S., 2005. Overexpression of proteasome beta5 assembled subunit increases the amount of proteasome and confers ameliorated response to oxidative stress and higher survival rates. *J. Biol. Chem.* 280, 11840-50.
- Christianson, J.C., Shaler, T.A., Tyler, R.E., Kopito, R.R., 2008. OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nat. Cell. Biol.* 10, 272-82.
- Ciechanover, A., Brundin, P., 2003. The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron*. 40, 427-46.
- Ciechanover, A., Orian, A., Schwartz, A.L., 2000. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical implications. *J. Cell. Biochem.* 34, 40-51.
- Clerc, S., Hirsch, C., Oggier, D.M., Deprez, P., Jakob, C., Sommer, T., Aebi, M., 2009. Htm1 protein generates the N-glycan signal for glycoprotein degradation in the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* 184, 159-72.
- Coughlan, M. T., Thorburn, D. R., Penfold, S. A., Laskowski, A., Harcourt, B. E., Sourris, K. C., Tan, A. L., Fukami, K., Thallas-Bonke, V., Nawroth, P. P., Brownlee, M., Bierhaus, A., Cooper, M. E., Forbes, J. M., 2009. RAGE-induced cytosolic ROS promote mitochondrial superoxide generation in diabetes. *J Am. Soc. Nephrol.* 20, 742-752.
- Covi, J.A., Belote, J.M., Mykles, D.L., 1999. Subunit compositions and catalytic properties of proteasomes from developmental temperature- sensitive mutants of *Drosophila melanogaster*. *Arch. Biochem. Biophys.* 368, 85-97.
- Cuervo, A.M., Palmer, A., Rivett, A.J., Knecht, E., 1995. Degradation of proteasomes by lysosomes in rat liver. *Eur. J. Biochem.* 227, 792-800.
- Cuervo, A.M., Wong, E.S., Martinez-Vicente, M., 2010. Protein degradation, aggregation, and misfolding. *Mov. Disord.* 25, S49-54.
- Cullinan, S.B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R.J., Diehl, J.A., 2003. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7198-209.
- da Fonseca, P.C., Morris, E.P., 2008. Structure of the human 26S proteasome: subunit radial displacements open the gate into the proteolytic core. *J. Biol. Chem.* 283, 23305-14.
- Dange, T., Smith, D., Noy, T., Rommel, P.C., Jurzitza, L., Cordero, R.J., Legendre, A., Finley, D., Goldberg, A.L., Schmidt, M., 2011. Bln10 protein promotes proteasomal substrate turnover by an active gating mechanism. *J. Biol. Chem.* 286, 42830-9.
- D'Arcy, P., Brnjic, S., Olofsson, M.H., Fryknäs, M., Lindsten, K., De Cesare, M., Perego, P., Sadeghi, B., Hassan, M., Larsson, R., Linder, S., 2011. Inhibition of proteasome deubiquitinating activity as a new cancer therapy. *Nat. Med.* 17, 1636-40.
- Davies, K.J., 2001. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie.* 83, 301-10.
- Day, S.M., Divald, A., Wang, P., Davis, F., Bartolone, S., Jones, R., Powell, S.R., 2013. Impaired assembly and post-translational regulation of 26S proteasome in human end-stage heart failure. *Circ. Heart Fail.* 6, 544-9.
- De La Mota-Peynado, A., Lee, S.Y., Pierce, B.M., Wani, P., Singh, C.R., Roelofs, J., 2013. The proteasome-associated protein Ecm29 inhibits proteasomal ATPase activity and *in vivo* protein degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem.* 2013 Aug 30. [Epub ahead of print]
- de Martino, M., Hoetzenecker, K., Ankersmit, H.J., Roth, G.A., Haitel, A., Waldert, M., Klatte, T., 2012. Serum 20S proteasome is elevated in patients with renal cell carcinoma and associated with poor prognosis. *Br J Cancer.* 106, 904-8.
- De Vrij, F.M., Sluijs, J.A., Gregori, L., Fischer, D.F., Hermens, W.T., Goldgaber, D., Verhaagen, J., Van Leeuwen, F.W., Hol, E.M., 2001. Mutant ubiquitin expressed in Alzheimer's disease causes neuronal death. *FASEB J.* 15, 2680-8.
- Deshaias, R.J., Joazeiro, C.A., 2009. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem.* 78, 399-434.
- Dice, J.F., 2007. Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 3, 295-9.
- Dick, T.P., Nussbaum, A.K., Deeg, M., Heinemeyer, W., Groll, M., Schirle, M., Keilholz, W., Stevanović, S., Wolf, D.H., Huber, R., Rammensee, H.G., Schild, H., 1998. Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *J. Biol. Chem.* 273, 25637-46.

- Dikic, I., Wakatsuki, S., Walters, K.J., 2009. Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 659-71.
- Dilley, T.K., Bowden, G.T., Chen, Q. M., 2003. Novel mechanisms of sublethal oxidant toxicity: Induction of premature senescence in human fibroblasts confers tumor promoter activity. *Exp Cell Res*, 290, 38-48.
- Dimopoulos, M.A., San-Miguel, J.F., Anderson, K.C., 2011. Emerging therapies for the treatment of relapsed or refractory multiple myeloma. *Eur. J. Haematol.* 86, 1-15.
- Ditzel, L., Huber, R., Mann, K., Heinemeyer, W., Wolf, D.H., Groll, M., 1998. Conformational constraints for protein self-cleavage in the proteasome. *J. Mol. Biol.* 279, 1187-91.
- Duffy, J.B., 2002. Gal4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 34, 1-15.
- Dupont, J., Holzenberger, M., 2003. Biology of insulin-like growth factors in development. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 69, 257-71.
- Durcan, T.M., Kontogiannia, M., Thorarinsdottir, T., Fallon, L., Williams, A.J., Djarmati, A., Fantaneanu, T., Paulson, H.L., Fon, E.A., 2011. The Machado-Joseph disease-associated mutant form of ataxin-3 regulates parkin ubiquitination and stability. *Hum. Mol. Genet.* 20, 141-54.
- El Khouri, E., Le Pavec, G., Toledano, M.B., Delaunay-Moisan, A., 2013. RNF185 is a novel E3 ligase of endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) that targets cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *J. Biol. Chem.* 288, 31177-91.
- Erickson, R.R., Dunning, L.M., Holtzman, J.L., 2006. The effect of aging on the chaperone concentrations in the hepatic, endoplasmic reticulum of male rats: the possible role of protein misfolding due to the loss of chaperones in the decline in physiological function seen with age. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 61, 435-43.
- Farout, L., Mary, J., Vinh, J., Szweda, L., Friguet, B., 2006. Inactivation of the proteasome by 4-hydroxy-2-nonenal is site specific and dependant on 20S proteasome subtypes. *Arch. Biochem. Biophys.* 453, 135-42.
- Feng, Y., Longo, D.L., Ferris, D.K., 2001. Polo-like kinase interacts with proteasomes and regulates their activity. *Cell Growth Differ.* 12, 29-37.
- Ferrington, D.A., Husom, A.D., Thompson, L.V., 2005. Altered proteasome structure, function, and oxidation in aged muscle. *FASEB J.* 19, 644-6.
- Fortschegger, K., Wagner, B., Voglauer, R., Katinger, H., Sibilja, M., Grillari, J., 2007. Early embryonic lethality of mice lacking the essential protein SNEV. *Mol. Cell Biol.* 27, 3123-30.
- Fredriksson, Å., Johansson Krogh, E., Hernebring, M., Pettersson, E., Javadi, A., Almstedt, A., Nyström, T., 2012. Effects of aging and reproduction on protein quality control in soma and gametes of *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* 11, 634-43.
- Frenkel, Z., Gregory, W., Kornfeld, S., Lederkremer, G.Z., 2003. Endoplasmic reticulum-associated degradation of mammalian glycoproteins involves sugar chain trimming to Man6-5GlcNAc2. *J. Biol. Chem.* 278, 34119-24.
- Frezza, M., Schmitt, S., Dou, Q.P., 2011. Targeting the ubiquitin-proteasome pathway: an emerging concept in cancer therapy. *Curr. Top Med. Chem.* 11, 2888-905.
- Fu, N.Y., Sukumaran, S.K., Kerk, S.Y., Yu, V.C., 2009. Baxbeta: a constitutively active human Bax isoform that is under tight regulatory control by the proteasomal degradation mechanism. *Mol. Cell* 33, 15-29.
- Fukunaga, K., Kudo, T., Toh-e, A., Tanaka, K., Saeki, Y., 2010. Dissection of the assembly pathway of the proteasome lid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 1048-53.
- Funakoshi, M., Tomko, R.J. Jr., Kobayashi, H., Hochstrasser, M., 2009. Multiple assembly chaperones govern biogenesis of the proteasome regulatory particle base. *Cell* 137, 887-99.
- Furukawa, M., Xiong, Y., 2005. BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase. *Mol. Cell Biol.* 25, 162-71.
- Fusco, C., Micale, L., Egorov, M., Monti, M., D'Addetta, E.V., Augello, B., Cozzolino, F., Calcagni, A., Fontana, A., Polishchuk, R.S., Didelot, G., Reymond, A., Pucci, P., Merla, G., 2012. The E3-ubiquitin ligase TRIM50 interacts with HDAC6 and p62, and promotes the sequestration and clearance of ubiquitinated proteins into the aggresome. *PLoS One* 7, e40440. doi: 10.1371/journal.pone.0040440.
- Futerman, A. H., van Meer, G., 2005. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:554-565.
- Gallastegui, N., Groll, M., 2010. The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine. *Trends Biochem. Sci.* 35, 634-42.
- Gerards, W.L., de Jong, W.W., Bloemendal, H., Boelens, W., 1998. The human proteasomal subunit HsC8 induces ring formation of other alpha-type subunits. *J. Mol. Biol.* 275, 113-21.

- Gerards, W.L., Enzlin, J., Häner, M., Hendriks, I.L., Aebi, U., Bloemendal, H., Boelens, W., 1997. The human alpha-type proteasomal subunit HsC8 forms a double ringlike structure, but does not assemble into proteasome-like particles with the beta-type subunits HsDelta or HsBPROS26. *J. Biol. Chem.* 272, 10080-6.
- Glickman, M.H., Ciechanover, A., 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 82, 373-428.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A., Finley, D., 1998. A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* 94, 615-23.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fried, V.A., Finley, D., 1998. The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3149-62.
- Goldberg, A.L., 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426, 895-899.
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W., Cong, J., 2003. The calpain system. *Physiol. Rev.* 83, 731-801.
- Gomes, A.V., Zong, C., Edmondson, R.D., Li, X., Stefani, E., Zhang, J., Jones, R.C., Thyparambil, S., Wang, G.W., Qiao, X., Bardag-Gorce, F., Ping, P., 2006. Mapping the murine cardiac 26S proteasome complexes. *Circ. Res.* 99, 362-71.
- Gomes-Marcondes, M.C., Tisdale, M.J., 2002. Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. *Cancer Lett.* 180, 69-74.
- Gorbea, C., Goellner, G.M., Teter, K., Holmes, R.K., Rechsteiner, M., 2004. Characterization of mammalian Ecm29, a 26 S proteasome-associated protein that localizes to the nucleus and membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 279, 54849-61.
- Gray, D.A., Tsirigotis, M., Woulfe, J., 2003. Ubiquitin, proteasomes, and the aging brain. *Sci. Aging Knowledge Environ.* 27, RE6.
- Griffin, T.A., Nandi, D., Cruz, M., Fehling, H.J., Kaer, L.V., Monaco, J.J., Colbert, R.A., 1998. Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *J. Exp. Med.* 187, 97-104.
- Grimberg, K.B., Beskow, A., Lundin, D., Davis, M.M., Young, P., 2011. Basic leucine zipper protein Cnc-C is a substrate and transcriptional regulator of the *Drosophila* 26S proteasome. *Mol. Cell. Biol.* 31, 897-909.
- Grimm, S., Ernst, L., Grötzinger, N., Höhn, A., Breusing, N., Reinheckel, T., Grune, T., 2010. Cathepsin D is one of the major enzymes involved in intracellular degradation of AGE-modified proteins. *Free Radic. Res.* 44, 1013-26.
- Grimm, S., Horlacher, M., Catalgol, B., Höhn, A., Reinheckel, T., Grune, T., 2012. Cathepsins D and L reduce the toxicity of advanced glycation end products. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 1011-23.
- Groll, M., Bajorek, M., Köhler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., Finley, D., 2000. A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol.* 7, 1062-7.
- Groll, M., Clausen, T., 2003. Molecular shredders: how proteasomes fulfill their role. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 665-73.
- Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., Huber, R., 1997. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386, 463-71.
- Grune, T., Catalgol, B., Licht, A., Ermak, G., Pickering, A.M., Ngo, J.K., Davies, K.J., 2011. HSP70 mediates dissociation and reassociation of the 26S proteasome during adaptation to oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1355-64.
- Grune, T., Merker, K., Jung, T., Sitte, N., Davies, K.J., 2005. Protein oxidation and degradation during postmitotic senescence. *Free Radic. Biol. Med.* 39, 1208-15.
- Grune, T., Merker, K., Sandig, G., Davies, K.J., 2003. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 709-18.
- Grune, T., Reinheckel, T., Joshi, M., Davies, K.J., 1995. Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress. Role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *J. Biol. Chem.* 270, 2344-51.
- Guarente, L., 2006. Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome. *Nature* 444, 868-74.
- Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P.P., Dikic, I., 2003. Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat. Cell. Biol.* 5, 461-6.
- Haigis, M.C., Yankner, B.A., 2010. The aging stress response. *Mol. Cell.* 40, 333-44.
- Han, Y.H., Park, W.H., 2009. Tiron, a ROS scavenger, protects human lung cancer Calu-6 cells against antimycin A-induced cell death. *Oncol Rep* 21, 253-261.

- Hansen, T.O., Sarup, P., Loeschcke, V., Rattan, S.I., 2012. Age-related and sex-specific differences in proteasome activity in individual *Drosophila* flies from wild type, longevity-selected and stress resistant strains. *Biogerontology* 13, 429-38.
- Hayflick, L., Moorhead, P.S., 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 25, 585-621.
- Hawse, J.R., Hejtmancik, J.F., Horwitz, J., Kantorow, M., 2004. Identification and functional clustering of global gene expression differences between age-related cataract and clear human lenses and aged human lenses. *Exp. Eye Res.* 79, 935-40.
- Heo, J.M., Nielson, J.R., Dephoure, N., Gygi, S.P., Rutter, J., 2013. Intramolecular interactions control Vms1 translocation to damaged mitochondria. *Mol. Biol. Cell* 24, 1263-73.
- Herman, D., 1981. The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* Nov;78(11):7124-8.
- Hernebring, M., Brolén, G., Aguilaniu, H., Semb, H., Nyström, T., 2006. Elimination of damaged proteins during differentiation of embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 7700-7705.
- Hershko, A., Ciechanover, A., 1998. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425-79.
- Heubner, M., Wimberger, P., Dahlmann, B., Kasimir-Bauer, S., Kimmig, R., Peters, J., Wohlschlaeger, J., Sixt, S.U., 2011. The prognostic impact of circulating proteasome concentrations in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 120, 233-8.
- Hirano, Y., Hayashi, H., Iemura, S., Hendil, K.B., Niwa, S., Kishimoto, T., Kasahara, M., Natsume, T., Tanaka, K., Murata, S., 2006. Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Mol. Cell* 24, 977-84.
- Hirano, Y., Hendil, K.B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K., Murata, S., 2005. A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature* 437, 1381-5.
- Hirano, Y., Kaneko, T., Okamoto, K., Bai, M., Yashiroda, H., Furuyama, K., Kato, K., Tanaka, K., Murata, S., 2008. Dissecting beta-ring assembly pathway of the mammalian 20S proteasome. *EMBO J.* 27, 2204-13.
- Hirao, K., Natsuka, Y., Tamura, T., Wada, I., Morito, D., Natsuka, S., Romero, P., Sleno, B., Tremblay, L.O., Herscovics, A., Nagata, K., Hosokawa, N., 2006. EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation and mannose trimming. *J. Biol. Chem.* 281, 9650-8.
- Hochstrasser, M., 2009. Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* 458, 422-9.
- Hoffmann, O., Heubner, M., Anlasik, T., Winterhalter, M., Dahlmann, B., Kasimir-Bauer, S., Kimmig, R., Wohlschlaeger, J., Sixt, S.U., 2011. Circulating 20S proteasome in patients with non-metastasized breast cancer. *Anticancer Res.* 31, 2197-201.
- Hofmann, R.M., Pickart, C.M., 1999. Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* 96, 645-53.
- Höhn, T.J., Grune, T., 2013. The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part III-Redox regulation of the proteasomal system. *Redox Biol.* 2, 388-394.
- Höhn, A., Jung, T., Grimm, S., Grune, T., 2010. Lipofuscin-bound iron is a major intracellular source of oxidants: role in senescent cells. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 1100-8.
- Höhn, A., Jung, T., Grimm, S., Catalgol, B., Weber, D., Grune, T., 2011. Lipofuscin inhibits the proteasome by binding to surface motifs. *Free Radic Biol Med.* 50, 585-591.
- Höhn, A., Sittig, A., Jung, T., Grimm, S., Grune, T., 2012. Lipofuscin is formed independently of macroautophagy and lysosomal activity in stress-induced prematurely senescent human fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 1760-9.
- Holland, R., Fishbein, J.C., 2010. Chemistry of the cysteine sensors in Kelch-like ECH-associated protein 1. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 1749-1761.
- Hope, A.D., de Silva, R., Fischer, D.F., Hol, E.M., van Leeuwen, F.W., Lees, A.J., 2003. Alzheimer's associated variant ubiquitin causes inhibition of the 26S proteasome and chaperone expression. *J. Neurochem.* 86, 394-404.
- Horn, S.C., Hanna, J., Hirsch, C., Volkwein, C., Schütz, A., Heinemann, U., Sommer, T., Jarosch, E., 2009. Usa1 functions as a scaffold of the HRD-ubiquitin ligase. *Mol. Cell.* 36, 782-93.
- Hosokawa, N., Kamiya, Y., Kamiya, D., Kato, K., Nagata, K., 2009. Human OS-9, a lectin required for glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation, recognizes mannose-trimmed N-glycans. *J. Biol. Chem.* 284, 17061-8.
- Hosokawa, N., Kato, K., Kamiya, Y., 2010. Mannose 6-phosphate receptor homology domain-containing lectins in mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation. *Methods Enzymol.* 480, 181-97.

- Hosokawa, N., Tremblay, L.O., Sleno, B., Kamiya, Y., Wada, I., Nagata, K., Kato, K., Herscovics, A., 2010. EDEM1 accelerates the trimming of alpha1,2-linked mannose on the C branch of N-glycans. *Glycobiology* 20, 567-75.
- Hosokawa, N., Wada, I., Natsuka, Y., Nagata, K., 2006. EDEM accelerates ERAD by preventing aberrant dimer formation of misfolded alpha1-antitrypsin. *Genes Cells* 11, 465-76.
- Hosokawa, N., You, Z., Tremblay, L.O., Nagata, K., Herscovics, A., 2007. Stimulation of ERAD of misfolded null Hong Kong alpha1-antitrypsin by Golgi alpha1,2-mannosidases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 626-32.
- Huang, J., Forsberg, N.E., 1998. Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95, 12100-5.
- Huang, Q., Wang, H., Perry, S.W., Figueiredo-Pereira, M.E., 2013. Negative regulation of 26S proteasome stability via calpain-mediated cleavage of Rpn10 subunit upon mitochondrial dysfunction in neurons. *J. Biol. Chem.* 288, 12161-74.
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., O'Shea, E.K., 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686-691.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S., Howley, P.M., 1995. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92, 5249.
- Husnjak, K., Elsasser, S., Zhang, N., Chen, X., Randles, L., Shi, Y., Hofmann, K., Walters, K.J., Finley, D., Dikic, I., 2008. Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature* 453, 481-8.
- Hyun, D.H., 2010. Effect of the overexpression of mutant ubiquitin (K48R) on the cellular response induced by 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal, an end-product of lipid peroxidation. *Neurosci. Lett.* 477, 115-20.
- Ikai, A., Nishigai, M., Tanaka, K., Ichihara, A., 1991. Electron microscopy of 26 S complex containing 20 S proteasome. *FEBS Lett.* 292, 21-4.
- Ikeda, F., Crosetto, N., Dikic, I., 2010. What determines the specificity and outcomes of ubiquitin signaling? *Cell* 143, 677-81.
- Imler, M., Gentier, R.J., Dennissen, F.J., Schulz, H., Bolle, I., Hölter, S.M., Kallnik, M., Cheng, J.J., Klingenspor, M., Rozman, J., Ehrhardt, N., Hermes, D.J., Gailus-Durner, V., Fuchs, H., Hrabě de Angelis, M., Meyer, H.E., Hopkins, D.A., Van Leeuwen, F.W., Beckers, J., 2012. Long-term proteasomal inhibition in transgenic mice by UBB(+1) expression results in dysfunction of central respiration control reminiscent of brainstem neuropathology in Alzheimer patients. *Acta Neuropathol.* 124, 187-97.
- Isasa, M., Katz, E.J., Kim, W., Yugo, V., González, S., Kirkpatrick, D.S., Thomson, T.M., Finley, D., Gygi, S.P., Crosas, B., 2010. Monoubiquitination of RPN10 regulates substrate recruitment to the proteasome. *Mol. Cell.* 38, 733-45.
- Iwafune, Y., Kawasaki, H., Hirano, H., 2002. Electrophoretic analysis of phosphorylation of the yeast 20S proteasome. *Electrophoresis.* 23, 329-38.
- Iwafune, Y., Kawasaki, H., Hirano, H., 2004. Identification of three phosphorylation sites in the alpha7 subunit of the yeast 20S proteasome *in vivo* using mass spectrometry. *Arch. Biochem. Biophys.* 431, 9-15.
- Iwai, K., Tokunaga, F., 2009. Linear polyubiquitination: a new regulator of NF-kappaB activation. *EMBO Rep.* 10, 706-13.
- Iyer, L.M., Burroughs, A.M., Aravind, L., 2006. The prokaryotic antecedents of the ubiquitin-signaling system and the early evolution of ubiquitin-like beta-grasp domains. *Genome Biol.* 7, R60.
- Jacobson, J., Lambert, A.J., Portero-Otín, M., Pamplona, R., Magwere, T., Miwa, S., Driege, Y., Brand, M.D., Partridge, L., 2010. Biomarkers of aging in *Drosophila*. *Aging Cell* 9, 466-77.
- Jahngen, J.H., Lipman, R.D., Eisenhauer, D.A., Jahngen, E.G. Jr., Taylor, A., 1990. Aging and cellular maturation cause changes in ubiquitin-eye lens protein conjugates. *Arch. Biochem. Biophys.* 276, 32-7.
- Jakob, C., Egerer, K., Liebisch, P., Türkmen, S., Zavrski, I., Kuckelkorn, U., Heider, U., Kaiser, M., Fleissner, C., Sterz, J., Kleeberg, L., Feist, E., Burmester, G.R., Kloetzel, P.M., Sezer, O., 2007. Circulating proteasome levels are an independent prognostic factor for survival in multiple myeloma. *Blood* 109, 2100-5.
- Jänen, S.B., Chaachouay, H., Richter-Landsberg, C., 2010. Autophagy is activated by proteasomal inhibition and involved in aggresome clearance in cultured astrocytes. *Glia* 58, 1766-74.
- Jeon, H.B., Choi, E.S., Yoon, J.H., Hwang, J.H., Chang, J.W., Lee, E.K., Choi, H.W., Park, Z.Y., Yoo, Y.J., 2007. A proteomics approach to identify the ubiquitinated proteins in mouse heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357, 731-6.

- Jia, L., Soengas, M.S., Sun, Y., 2009. ROC1/RBX1 E3 ubiquitin ligase silencing suppresses tumor cell growth via sequential induction of G2-M arrest, apoptosis, and senescence. *Cancer Res.* 69, 4974-82.
- Johnson, E.S., Ma, P.C., Ota, I.M., Varshavsky, A., 1995. A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J. Biol. Chem.* 270, 17442-56.
- Ju, D., Xie, Y., 2004. Proteasomal degradation of RPN4 via two distinct mechanisms, ubiquitin-dependent and -independent. *J. Biol. Chem.* 279, 23851-4.
- Jung, T., Bader, N., Grune T., 2007. Lipofuscin: formation, distribution, and metabolic consequences. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1119, 97-111.
- Jung, T., Catalgol, B., Grune, T., 2009. The proteasomal system. *Mol. Aspects Med.* 30, 191-296.
- Kajava, A.V., 2002. What curves alpha-solenoids? Evidence for an alpha-helical toroid structure of Rpn1 and Rpn2 proteins of the 26 S proteasome. *J. Biol. Chem.* 277, 49791-8.
- Kajava, A.V., Gorbea, C., Ortega, J., Rechsteiner, M., Steven AC., 2004. New HEAT-like repeat motifs in proteins regulating proteasome structure and function. *J. Struct. Biol.* 146, 425-30.
- Kane, R.C., Dagher, R., Farrell, A., Ko, C.W., Sridhara, R., Justice, R., Pazdur, R., 2007. Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 13, 5291-4.
- Kansanen, E., Kuosmanen, S.M., Leinonen, H., Levonen, A.L., 2013. The Keap1-Nrf2 pathway: mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1, 45-49.
- Kanski, J., Alterman, M.A., Schöneich, C., 2003. Proteomic identification of age-dependent protein nitration in rat skeletal muscle. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 1229-39.
- Kao, S.Y., 2009. Regulation of DNA repair by parkin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 382, 321-5.
- Kapeta, S., Chondrogianni, N., Gonos, E.S., 2010. Nuclear erythroid factor 2-mediated proteasome activation delays senescence in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 285, 8171-84.
- Karbowski, M., Neutzner, A., Youle, R.J., 2007. The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division. *J. Cell Biol.* 178, 71-84.
- Karbowski, M., Youle, R.J., 2011. Regulating mitochondrial outer membrane proteins by ubiquitination and proteasomal degradation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 476-82.
- Kaspar, J.W., Niture, S.K., Jaiswal, A.K., 2012. Antioxidant-induced INrf2 (Keap1) tyrosine 85 phosphorylation controls the nuclear export and degradation of the INrf2-Cul3-Rbx1 complex to allow normal Nrf2 activation and repression. *J. Cell Sci.* 125, 1027-38.
- Kastle, M., Grune, T., 2011. Protein oxidative modification in the aging organism and the role of the ubiquitin proteasomal system. *Curr. Pharm. Des.* 17, 4007-22.
- Kästle, M., Grune, T., 2012. Interactions of the proteasomal system with chaperones: protein triage and protein quality control. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 109, 113-60.
- Katsiki, M., Chondrogianni, N., Chinou, I., Rivett, A.J., Gonos, E.S., 2007. The olive constituent oleuropein exhibits proteasome stimulatory properties *in vitro* and confers life span extension of human embryonic fibroblasts. *Rejuvenation Res.* 10, 157-72.
- Kawaguchi, Y., Kovacs, J.J., McLaurin, A., Vance, J.M., Ito, A., Yao, T.P., 2003. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* 115, 727-38.
- Kensler, T.W., Wakabayashi, N., 2010. Nrf2: friend or foe for chemoprevention? *Carcinogenesis* 31, 90-9.
- Kenyon, C., 2010a. A pathway that links reproductive status to lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1204, 156-62.
- Kenyon, C.J., 2010b. The genetics of ageing. *Nature* 464, 504-12.
- Khor, B., Bredemeyer, A.L., Huang, C.Y., Turnbull, I.R., Evans, R., Maggi, L.B. Jr., White, J.M., Walker, L.M., Carnes, K., Hess, R.A., Sleckman, B.P., 2006. Proteasome activator PA200 is required for normal spermatogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2999-3007.
- Khurana, V., Elson-Schwab, I., Fulga, T. A., Sharp, K. A., Loewen, C. A., Mulkearns, E., Tyynelö, J., Scherzer, C. R., Feany, M. B., 2010. Lysosomal dysfunction promotes cleavage and neurotoxicity of tau *in vivo*. *PLoS Genet.* 6, e1001026.
- Kikkert, M., Doolman, R., Dai, M., Avner, R., Hassink, G., van Voorden, S., Thanedar, S., Roitelman, J., Chau, V., Wiertz, E., 2004. Human HRD1 is an E3 ubiquitin ligase involved in degradation of proteins from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 279, 3525-34.
- Kikkert, M., Hassink, G., Barel, M., Hirsch, C., van der Wal, F.J., Wiertz, E., 2001. Ubiquitination is essential for human cytomegalovirus US11-mediated dislocation of MHC class I molecules from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Biochem J.* 358, 369-77.
- Kikuchi, J., Iwafune, Y., Akiyama, T., Okayama, A., Nakamura, H., Arakawa, N., Kimura, Y., Hirano, H., 2010. Co- and post-translational modifications of the 26S proteasome in yeast. *Proteomics* 10, 2769-79.

- Kim, M.S., Ramakrishna, S., Lim, K.H., Kim, J.H., Baek, K.H., 2011. Protein stability of mitochondrial superoxide dismutase SOD2 is regulated by USP36. *J. Cell. Biochem.* 112, 498-508.
- Kim, S.K., 2007. Common aging pathways in worms, flies, mice and humans. *J. Exp. Biol.* 210, 1607-1612.
- Kimura, H.J., Chen, C.Y., Tzou, S.C., Rocchi, R., Landek-Salgado, M.A., Suzuki, K., Kimura, M., Rose, N.R., Caturegli, P., 2009. Immunoproteasome overexpression underlies the pathogenesis of thyroid oncocytes and primary hypothyroidism: studies in humans and mice. *PLoS One* 4, e7857. doi: 10.1371/journal.pone.0007857.
- Kirisako, T., Kamei, K., Murata, S., Kato, M., Fukumoto, H., Kanie, M., Sano, S., Tokunaga, F., Tanaka, K., Iwai, K., 2006. A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *EMBO J.* 25, 4877-87.
- Kirkin, V., Lamark, T., Johansen, T., Dikic, I., 2009. NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets. *Autophagy* 5, 732-3.
- Kirkin, V., Lamark, T., Sou, Y.S., Bjørkøy, G., Nunn, J.L., Bruun, J.A., Shvets, E., McEwan, D.G., Clausen, T.H., Wild, P., Bilusic, I., Theurillat, J.P., Øvervatn, A., Ishii, T., Elazar, Z., Komatsu, M., Dikic, I., Johansen, T., 2009. A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell* 33, 505-16.
- Kirkwood, T.B.L., Austad, S.N., 2000. Why do we age? *Nature* 408, 233-238.
- Kirkwood, T.B., 2002. Evolution of ageing. *Mech. Ageing Dev.* 123, 737-45.
- Kourtis, N., Tavernarakis, N., 2011. Cellular stress response pathways and ageing: intricate molecular relationships. *EMBO J.* 30, 2520-2531.
- Kloetzel, P.M., Ossendorp, F., 2004. Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol* 16, 76-81.
- Korolchuk, V.I., Mansilla, A., Menzies, F.M., Rubinsztein, D.C., 2009. Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. *Mol. Cell.* 33, 517-27.
- Korolchuk, V.I., Menzies, F.M., Rubinsztein, D.C., 2010. Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Lett.* 584, 1393-8.
- Kruegel, U., Robison, B., Dange, T., Kahlert, G., Delaney, J.R., Kotireddy, S., Tsuchiya, M., Tsuchiyama, S., Murakami, C.J., Schleit, J., Sutphin, G., Carr, D., Tar, K., Dittmar, G., Kaeberlein, M., Kennedy, B.K., Schmidt, M., 2011. Elevated proteasome capacity extends replicative lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 7, e1002253.
- Kucherenko, M. M., Marrone, A. K., Rishko, V. M., Yatsenko, A. S., Klepzig, A., Shcherbata, H. R., 2010. Paraffin embedded and frozen sections of *Drosophila* adult muscles. *J. Vis. Exp.* 46, pii: 2438.
- Kudlow, B.A., Kennedy, B.K., 2006. Aging: progeria and the lamin connection. *Curr. Biol.* 16, R652-4.
- Kulkarni, M., Smith, H.E., 2008. E1 ubiquitin-activating enzyme UBA-1 plays multiple roles throughout *C. elegans* development. *PLoS Genet.* 4, e1000131. doi: 10.1371/journal.pgen.1000131.
- Kunjappu, M.J., Hochstrasser, M., 2013. Assembly of the 20S proteasome. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013 Mar 16. doi:pii: S0167-4889(13)00099-2. 10.1016/j.bbamcr.2013.03.008.
- Kusmierczyk, A.R., Kunjappu, M.J., Funakoshi, M., Hochstrasser, M., 2008. A multimeric assembly factor controls the formation of alternative 20S proteasomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 237-44.
- Kusmierczyk, A.R., Kunjappu, M.J., Kim, R.Y., Hochstrasser, M., 2011. A conserved 20S proteasome assembly factor requires a C-terminal HbYX motif for proteasomal precursor binding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 622-9.
- Kwak, M.K., Wakabayashi, N., Greenlaw, J.L., Yamamoto, M., Kensler, T.W., 2003. Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8786-94.
- Lamark, T., Kirkin, V., Dikic, I., Johansen, T., 2009. NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets. *Cell Cycle.* 8, 1986-90.
- Lander, G.C., Estrin, E., Matyskiela, M.E., Bashore, C., Nogales, E., Martin, A., 2012. Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature* 482, 186-91.
- Lanneau, D., Wettstein, G., Bonniaud, P., Garrido, C., 2010. Heat shock proteins: cell protection through protein triage. *Scientific World Journal.* 10, 1543-52.
- Lavabre-Bertrand, T., Henry, L., Carillo, S., Guiraud, I., Ouali, A., Dutaud, D., Aubry, L., Rossi, J.F., Bureau, J.P., 2001. Plasma proteasome level is a potential marker in patients with solid tumors and hemopoietic malignancies. *Cancer* 92, 2493-500.

- Le Tallec, B., Barrault, M.B., Courbeyrette, R., Guérois, R., Marsolier-Kergoat, M.C., Peyroche, A., 2007. 20S proteasome assembly is orchestrated by two distinct pairs of chaperones in yeast and in mammals. *Mol. Cell.* 27,660-74.
- Le Tallec, B., Barrault, M.B., Guérois, R., Carré, T., Peyroche, A., 2009. Hsm3/S5b participates in the assembly pathway of the 19S regulatory particle of the proteasome. *Mol. Cell* 33, 389-99.
- Lederkremer, G.Z., 2009. Glycoprotein folding, quality control and ER-associated degradation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19, 515-23.
- Lee, S.Y., De la Mota-Peynado, A., Roelofs, J., 2011. Loss of Rpt5 protein interactions with the core particle and Nas2 protein causes the formation of faulty proteasomes that are inhibited by Ecm29 protein. *J. Biol. Chem.* 286, 36641-51.
- Lee, T.V., Ding, T., Chen, Z., Rajendran, V., Scherr, H., Lackey, M., Bolduc, C., Bergmann, A., 2008. The E1 ubiquitin-activating enzyme Uba1 in *Drosophila* controls apoptosis autonomously and tissue growth non-autonomously. *Development* 135, 43-52.
- Lehmann, A., Janek, K., Braun, B., Kloetzel, P.M., Enenkel, C., 2002. 20 S proteasomes are imported as precursor complexes into the nucleus of yeast. *J. Mol. Biol.* 317, 401-13.
- Lehmann, A., Niewianda, A., Jechow, K., Janek, K., Enenkel, C., 2010. Ecm29 fulfils quality control functions in proteasome assembly. *Mol. Cell* 38, 879-88.
- Lehmann, C., Begley, T.P., Ealick, S.E., 2006. Structure of the Escherichia coli ThiS-ThiF complex, a key component of the sulfur transfer system in thiamin biosynthesis. *Biochemistry* 45, 11-9.
- Levine, B., Kroemer, G., 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27-42.
- Li, M., Shin, Y.H., Hou, L., Huang, X., Wei, Z., Klann, E., Zhang, P., 2008. The adaptor protein of the anaphase promoting complex Cdh1 is essential in maintaining replicative lifespan and in learning and memory. *Nat. Cell. Biol.* 10, 1083-9.
- Li, W., Bengtson, M.H., Ulbrich, A., Matsuda, A., Reddy, V.A., Orth, A., Chanda, S.K., Batalov, S., Joazeiro, C.A., 2008. Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS One* 3, e1487. doi: 10.1371/journal.pone.0001487.
- Li, W.W., Li, J., Bao, J.K., 2012. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol. Life Sci.* 69, 1125-36.
- Lilley, B.N., Ploegh, H.L., 2005. Multiprotein complexes that link dislocation, ubiquitination, and extraction of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102, 14296-301.
- Lin, S.J., Defossez, P.A., Guarente, L. 2000. Requirement of NAD and Sir2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289, 2126.
- Lin, S.J., Kaeberlein, M., Andalis, A.A., Sturtz, L.A., Defossez, P.A., Culotta, V.C., Fink, G.R., Guarente, L., 2002. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 418, 344.
- Liu, F.T., Agrawal, S.G., Gribben, J.G., Ye, H., Du, M.Q., Newland, A.C., Jia, L., 2008. Bortezomib blocks Bax degradation in malignant B cells during treatment with TRAIL. *Blood* 111, 2797-805.
- Liu, H.Y., Pfleger, C.M., 2013. Mutation in E1, the ubiquitin activating enzyme, reduces *Drosophila* lifespan and results in motor impairment. *PLoS One* 8, e32835.
- Livnat-Levanon, N., Glickman, M.H., 2011. Ubiquitin-proteasome system and mitochondria - reciprocity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1809, 80-7.
- Lopez, A.D., Tar, K., Krügel, U., Dange, T., Ros, I.G., Schmidt, M., 2011. Proteasomal degradation of Sfp1 contributes to the repression of ribosome biogenesis during starvation and is mediated by the proteasome activator Bln10. *Mol. Biol. Cell.* 22, 528-40.
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., Kroemer, G., 2013. The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194-217.
- Löw, P., Varga, Á., Pircs, K., Nagy, P., Szatmári, Z., Sass, M., Juhász, G., 2013. Impaired proteasomal degradation enhances autophagy via hypoxia signaling in *Drosophila*. *BMC Cell Biol.* 14, 29.
- Lundgren, J., Masson, P., Mirzaei, Z., Young, P., 2005. Identification and characterization of a *Drosophila* proteasome regulatory network. *Mol Cell Biol.* 25, 4662-4675.
- Mannhaupt, G., Schnall, R., Karpov, V., Vetter, I., Feldmann, H., 1999. Rpn4p acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast. *FEBS Lett.* 450, 27-34.
- Margineantu, D.H., Emerson, C.B., Diaz, D., Hockenbery, D.M., 2007. Hsp90 inhibition decreases mitochondrial protein turnover. *PLoS One* 2, e1066.
- Marzabadi, M. R., Sohal, R.S., Brunk, U.T., 1991. Mechanisms of lipofuscinogenesis: effect of the inhibition of lysosomal proteinases and lipases under varying concentrations of ambient oxygen in cultured rat neonatal myocardial cells. *APMIS* 99, 416-426.

- Mason, G.G., Hendil, K.B., Rivett, A.J., 1996. Phosphorylation of proteasomes in mammalian cells. Identification of two phosphorylated subunits and the effect of phosphorylation on activity. *Eur. J. Biochem.* 238, 453-62.
- Matsumoto, G., Wada, K., Okuno, M., Kurosawa, M., Nukina, N., 2011. Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Mol. Cell* 44, 279-89.
- Matsushima, Y., Kaguni, L.S., 2012. Matrix proteases in mitochondrial DNA function. *Biochim Biophys Acta.* 1819, 1080-7.
- Maupin-Furlow, J.A., 2013. Ubiquitin-like proteins and their roles in archaea. *Trends Microbiol.* 21, 31-8.
- Maytal-Kivity, V., Reis, N., Hofmann, K., Glickman, M.H., 2002. MPN+, a putative catalytic motif found in a subset of MPN domain proteins from eukaryotes and prokaryotes, is critical for Rpn11 function. *BMC Biochem.* 3, 28.
- McCall, M.R., Frei, B., 1999. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1034-53.
- Mecocci, P., Fanó, G., Fulle, S., MacGarvey, U., Shinobu, L., Polidori, M.C., Cherubini, A., Vecchiet, J., Senin, U., Beal, M.F., 1999. Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids, and proteins in human skeletal muscle. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 303-8.
- Merker, K., Sitte, N., Grune, T., 2000. Hydrogen peroxide-mediated protein oxidation in young and old human MRC-5 fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 375, 50-4.
- Merker, K., Ullrich, O., Schmidt, H., Sitte, N., Grune, T., 2003. Stability of the nuclear protein turnover during cellular senescence of human fibroblasts. *FASEB J.* 17, 1963-5.
- Mesquita, A., Weinberger, M., Silva, A., Sampaio-Marques, B., Almeida, B., Leão, C., Costa, V., Rodrigues, F., Burhans, W.C., Ludovico, P., 2010. Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H₂O₂ and superoxide dismutase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 107, 15123-8.
- Metzger, M.B., Hristova, V.A., Weissman, A.M., 2012. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J. Cell Sci.* 125, 531-7.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., Klionsky, D.J., 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069-75.
- Moore, S.C., Jason, L., Ausió, J., 2002. The elusive structural role of ubiquitinated histones. *Biochem. Cell Biol.* 80, 311-9.
- Moskalev, A.A., Smit-McBride, Z., Shaposhnikov, M.V., Plyusnina, E.N., Zhavoronkov, A., Budovsky, A., Tacutu, R., Fraifeld, V.E., 2012. Gadd45 proteins: relevance to aging, longevity and age-related pathologies. *Ageing Res. Rev.* 11, 51-66.
- Murata, S., Chiba, T., Tanaka, K., 2003. CHIP: a quality-control E3 ligase collaborating with molecular chaperones. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 572-8.
- Muratani, M., Tansey, W.P., 2003. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 192-201.
- Murga, M., Bunting, S., Montaña, M.F., Soria, R., Mulero, F., Cañamero, M., Lee, Y., McKinnon, P.J., Nussenzweig, A., Fernandez-Capetillo, O., 2009. A mouse model of ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging. *Nat. Genet.* 41, 891-8.
- Myeku, N., Figueiredo-Pereira, M.E., 2011. Dynamics of the degradation of ubiquitinated proteins by proteasomes and autophagy: association with sequestosome 1/p62. *J. Biol. Chem.* 286, 22426-40.
- Nagy, I., Tamura, T., Vanderleyden, J., Baumeister, W., De Mot, R., 1998. The 20S proteasome of *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 180, 5448-53.
- Naidoo, N., Ferber, M., Master, M., Zhu, Y., Pack, A.I., 2008. Aging impairs the unfolded protein response to sleep deprivation and leads to proapoptotic signaling. *J. Neurosci.* 28, 6539-48.
- Nakamura, N., Hirose, S., 2008. Regulation of mitochondrial morphology by USP30, a deubiquitinating enzyme present in the mitochondrial outer membrane. *Mol. Biol. Cell.* 19, 1903-11.
- Nakamura, N., Kimura, Y., Tokuda, M., Honda, S., Hirose, S., 2006. MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep.* 7, 1019-22.
- Nandi, D., Woodward, E., Ginsburg, D.B., Monaco, J.J., 1997. Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits. *EMBO J.* 16, 5363-75.
- Nanua, S., Murakami, M., Xia, J., Grenda, D.S., Woloszynek, J., Strand, M., Link, D.C., 2011. Activation of the unfolded protein response is associated with impaired granulopoiesis in transgenic mice expressing mutant Elane. *Blood* 117, 3539-47.
- Navarro, C.L., Cau, P., Lévy, N., 2006. Molecular bases of progeroid syndromes. *Hum. Mol. Genet.* 15 Spec No 2, R151-61.

- Nederlof, P.M., Wang, H.R., Baumeister, W., 1995. Nuclear localization signals of human and *Thermoplasma* proteasomal alpha subunits are functional *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 12060-4.
- Nedić, O., Rattan, S.I., Grune, T., Trougakos, I.P., 2013. Molecular effects of advanced glycation end products (AGEs) on cell signalling pathways, ageing and pathophysiology. *Free Radic. Res.* 47 Suppl 1, 28-38.
- Negrini, S., Gorgoulis, V.G., Halazonetis, T.D., 2010. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev.Mol.Cell Biol.* 11, 20-8.
- Neutznner, A., Youle, R.J., Karbowski, M., 2007. Outer mitochondrial membrane protein degradation by the proteasome. *Novartis Found Symp.* 287, 4-14.
- Niccoli, T., Partridge, L., 2012. Ageing as a risk factor for disease. *Curr Biol.* 22, R741-52.
- Nickell, S., Mihalache, O., Beck, F., Hegerl, R., Korinek, A., Baumeister, W., 2007. Structural analysis of the 26S proteasome by cryoelectron tomography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, 115-20.
- Nie, B., Gan, W., Shi, F., Hu, G.X., Chen, L.G., Hayakawa, H., Sekiguchi, M., Cai, J.P., 2013. Age-dependent accumulation of 8-oxoguanine in the DNA and RNA in various rat tissues. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2013, 303181.
- Niforou, K., Cheimonidou, C., Trougakos, I.P., 2014. Molecular chaperones and proteostasis regulation during redox imbalance. *Redox Biol.* 2, 323-332.
- Nijman, S.M., Luna-Vargas, M.P., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M., Sixma, T.K., Bernards, R., 2005. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 123, 773-86.
- Nishikawa, S., Brodsky, J.L., Nakatsukasa, K., 2005. Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD). *J. Biochem.* 137, 551-5.
- Niture, S.K., Jain, A.K., Jaiswal, A.K., 2009. Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *J. Cell Sci.* 122, 4452-64.
- Numazawa, S., Yoshida, T., 2004. Nrf2-dependent gene expressions: a molecular toxicological aspect. *J. Toxicol. Sci.* 29, 81-89.
- Nuss, J.E., Choksi, K.B., DeFord, J.H., Papaconstantinou, J., 2008. Decreased enzyme activities of chaperones PDI and BiP in aged mouse livers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365, 355-61.
- Odunuga, O.O., Hornby, J.A., Bies, C., Zimmermann, R., Pugh, D.J., Blatch, G.L., 2003. Tetratricopeptide repeat motif-mediated Hsc70-mSTI1 interaction. Molecular characterization of the critical contacts for successful binding and specificity. *J. Biol. Chem.* 278, 6896-904.
- Olivari, S., Cali, T., Salo, K.E., Paganetti, P., Ruddock, L.W., Molinari, M., 2006. EDEM1 regulates ER-associated degradation by accelerating de-mannosylation of folding-defective polypeptides and by inhibiting their covalent aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349, 1278-84.
- Olivari, S., Molinari, M., 2007. Glycoprotein folding and the role of EDEM1, EDEM2 and EDEM3 in degradation of folding-defective glycoproteins. *FEBS Lett.* 581, 3658-64.
- Parcellier, A., Brunet, M., Schmitt, E., Col, E., Didelot, C., Hammann, A., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Khochbin, S., Solary, E., Garrido, C., 2006. HSP27 favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27Kip1 and helps S-phase re-entry in stressed cells. *FASEB J.* 20, 1179-81.
- Parcellier, A., Schmitt, E., Gurbuxani, S., Seigneurin-Berny, D., Pance, A., Chantôme, A., Plenchette, S., Khochbin, S., Solary, E., Garrido, C., 2003. HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5790-802.
- Park, S., Kim, W., Tian, G., Gygi, S.P., Finley, D., 2011. Structural defects in the regulatory particle-core particle interface of the proteasome induce a novel proteasome stress response. *J. Biol. Chem.* 286, 36652-66.
- Park, S., Li, X., Kim, H.M., Singh, C.R., Tian, G., Hoyt, M.A., Lovell, S., Battaile, K.P., Zolkiewski, M., Coffino, P., Roelofs, J., Cheng, Y., Finley, D., 2013. Reconfiguration of the proteasome during chaperone-mediated assembly. *Nature* 497, 512-6.
- Pallauf, K., Rimbach, G., 2013. Autophagy, polyphenols and healthy ageing. *Ageing Res Rev.* 12, 237-252.
- Pelzer, C., Kassner, I., Matentzoglou, K., Singh, R.K., Wollscheid, H.P., Scheffner, M., Schmidtke, G., Groettrup, M., 2007. UBE1L2, a novel E1 enzyme specific for ubiquitin. *J. Biol. Chem.* 282, 23010-4.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., Gygi, S.P., 2003. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat. Biotechnol.* 21, 921-6.

- Peters, J.M., Harris, J.R., Kleinschmidt, J.A., 1991. Ultrastructure of the approximately 26S complex containing the approximately 20S cylinder particle (multicatalytic proteinase/proteasome). *Eur. J. Cell. Biol.* 56, 422-32.
- Pickart, C.M., 2000. Ubiquitin in chains. *Trends Biochem. Sci.* 25, 544-8.
- Pickering, A.M., Davies, K.J., 2012a. Degradation of Damaged Proteins: The Main Function of the 20S Proteasome. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 109, 227-248.
- Pickering, A.M., Linder, R.A., Zhang, H., Forman, H.J., Davies, K.J., 2012b. Nrf2-dependent induction of proteasome and Pa28 $\alpha\beta$ regulator are required for adaptation to oxidative stress. *J Biol Chem.* 287, 10021-10031.
- Pinato, S., Gatti, M., Scandiuizzi, C., Confalonieri, S., Penengo, L., 2011. UMI, a novel RNF168 ubiquitin binding domain involved in the DNA damage signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 31, 118-26.
- Plempner, R.K., Egner, R., Kuchler, K., Wolf, D.H., 1998. Endoplasmic reticulum degradation of a mutated ATP-binding cassette transporter Pdr5 proceeds in a concerted action of Sec61 and the proteasome. *J. Biol. Chem.* 273, 32848-56.
- Ploegh, H.L., 2007. A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature* 448, 435-8.
- Pouch, M.N., Cournoyer, B., Baumeister, W., 2000. Characterization of the 20S proteasome from the actinomycete *Frankia*. *Mol. Microbiol.* 35, 368-77.
- Powers, E.T., Morimoto, R.I., Dillin, A., Kelly, J.W., Balch, W.E., 2009. Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu.Rev.Biochem.* 78, 959-91.
- Pozzi, C., Valtorta, M., Tedeschi, G., Galbusera, E., Pastori, V., Bigi, A., Nonnis, S., Grassi, E., Fusi, P., 2008. Study of subcellular localization and proteolysis of ataxin-3. *Neurobiol. Dis.* 30, 190-200.
- Quan, E.M., Kamiya, Y., Kamiya, D., Denic, V., Weibezahn, J., Kato, K., Weissm, J.S., 2008. Defining the glycan destruction signal for endoplasmic reticulum-associated degradation. *Mol. Cell* 32, 870-7.
- Radhakrishnan, S.K., Lee, C.S., Young, P., Beskow, A., Chan, J.Y., Deshaies, R.J., 2010. Transcription factor Nrf1 mediates the proteasome recovery pathway after proteasome inhibition in mammalian cells. *Mol. Cell* 38, 17-28.
- Rahman, M.M., Sykietis, G.P., Nishimura, M., Bodmer, R., Bohmann, D., 2013. Declining signal dependence of Nrf2-MafS-regulated gene expression correlates with aging phenotypes. *Aging Cell* 12, 554-62.
- Ramos, P.C., Höckendorff, J., Johnson, E.S., Varshavsky, A., Dohmen, R.J., 1998. Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly. *Cell* 92, 489-99.
- Ramos-Gomez, M., Kwak, M.K., Dolan, P.M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P., Kensler, T.W., 2001. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 3410-3415.
- Rana, A., Rera, M., Walker, D.W., 2013. Parkin overexpression during aging reduces proteotoxicity, alters mitochondrial dynamics, and extends lifespan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 110, 8638-43.
- Rapoport, T.A., 2007. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* 450, 663-9.
- Rattan, S.I., 2008. Hormesis in aging. *Ageing Res. Rev.* 7, 63-78.
- Rattan, S.I., 2008. Increased molecular damage and heterogeneity as the basis of aging. *Biol. Chem.* 389, 267-72.
- Rattan, S.I., 2012. Biogerontology: from here to where? The Lord Cohen Medal Lecture-2011. *Biogerontology* 13, 83-91.
- Rattan, S.I., Clark, B.F., 2005. Understanding and modulating ageing. *IUBMB Life* 57, 297-304.
- Reinheckel, T., Sitte, N., Ullrich, O., Kuckelkorn, U., Davies, K.J., Grune, T., 1998. Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *Biochem. J.* 335, 637-42.
- Richter-Landsberg, C., Leyk, J., 2013. Inclusion body formation, macroautophagy, and the role of HDAC6 in neurodegeneration. *Acta. Neuropathol.* 2013 Aug 3. [Epub ahead of print]
- Rock, K.L., Goldberg, A.L., 1999. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 739-79.
- Rodriguez, K.A., Edrey, Y.H., Osmulski, P., Gaczynska, M., Buffenstein, R., 2012. Altered composition of liver proteasome assemblies contributes to enhanced proteasome activity in the exceptionally long-lived naked mole-rat. *PLoS One* 7, e35890.

- Roelofs, J., Park, S., Haas, W., Tian, G., McAllister, F.E., Huo, Y., Lee, B.H., Zhang, F., Shi, Y., Gygi, S.P., Finley, D., 2009. Chaperone-mediated pathway of proteasome regulatory particle assembly. *Nature* 459, 861-5.
- Romero-Granados, R., Fontán-Lozano, Á., Aguilar-Montilla, F.J., Carrión, Á.M., 2012. Postnatal proteasome inhibition induces neurodegeneration and cognitive deficiencies in adult mice: a new model of neurodevelopment syndrome. *PLoS One* 6, e28927. doi: 10.1371/journal.pone.0028927.
- Ron, D., Walter, P., 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8, 519-29.
- Rosenzweig, R., Osmulski, P.A., Gaczynska, M., Glickman, M.H., 2008. The central unit within the 19S regulatory particle of the proteasome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 573-80.
- Rubin, D.M., Glickman, M.H., Larsen, C.N., Dhruvakumar, S., Finley, D., 1998. Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *EMBO J.* 17, 4909-19.
- Ruotolo, R., Grassi, F., Percudani, R., Rivetti, C., Martorana, D., Maraini, G., Ottonello, S., 2003. Gene expression profiling in human age-related nuclear cataract. *Mol. Vis.* 9, 538-48.
- Ruschak, A.M., Slassi, M., Kay, L.E., Schimmer, A.D., 2011. Novel proteasome inhibitors to overcome bortezomib resistance. *J. Natl. Cancer Inst.* 103, 1007-17.
- Saeki, Y., Tanaka, K., 2012. Assembly and function of the proteasome. *Methods Mol. Biol.* 832, 315-37.
- Saeki, Y., Toh-E, A., Kudo, T., Kawamura, H., Tanaka, K., 2009. Multiple proteasome-interacting proteins assist the assembly of the yeast 19S regulatory particle. *Cell* 137, 900-13.
- Sasaki, K., Hamazaki, J., Koike, M., Hirano, Y., Komatsu, M., Uchiyama, Y., Tanaka, K., Murata, S., 2010. PAC1 gene knockout reveals an essential role of chaperone-mediated 20S proteasome biogenesis and latent 20S proteasomes in cellular homeostasis. *Mol. Cell. Biol.* 30, 3864-74.
- Sato, B.K., Schulz, D., Do, P.H., Hampton, R.Y., 2009. Misfolded membrane proteins are specifically recognized by the transmembrane domain of the Hrd1p ubiquitin ligase. *Mol. Cell* 34, 212-22.
- Sato, T., Sako, Y., Sho, M., Momohara, M., Suico, M.A., Shuto, T., Nishitoh, H., Okiyonedo, T., Kokame, K., Kaneko, M., Taura, M., Miyata, M., Chosa, K., Koga, T., Morino-Koga, S., Wada, I., Kai, H., 2012. STT3B-dependent posttranslational N-glycosylation as a surveillance system for secretory protein. *Mol. Cell* 47, 99-110.
- Schmitz, A., Herrgen, H., Winkeler, A., Herzog, V., 2000. Cholera toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex. *J. Cell. Biol.* 148, 1203-12.
- Schulz, J.B., 2008. Update on the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neurol.* 255 Suppl 5, 3-7. doi: 10.1007/s00415-008-5011-4.
- Schwickart, M., Huang, X., Lill, J.R., Liu, J., Ferrando, R., French, D.M., Maecker, H., O'Rourke, K., Bazan, F., Eastham-Anderson, J., Yue, P., Dornan, D., Huang, D.C., Dixit, V.M., 2010. Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature* 463, 103-7.
- Scruggs, S.B., Zong, N.C., Wang, D., Stefani, E., Ping, P., 2012. Post-translational modification of cardiac proteasomes: functional delineation enabled by proteomics. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 303, H9-18.
- Shabek, N., Iwai, K., Ciechanover, A., 2007. Ubiquitin is degraded by the ubiquitin system as a monomer and as part of its conjugated target. *Biochem Biophys Res Commun.* 363, 425-31.
- Sharp, P.M., Li, W.H., 1987. Molecular evolution of ubiquitin genes. *Trends Ecol. Evol.* 2, 328-32.
- Shenvi, S.V., Smith, E., Hagen, T.M., 2012. Identification of age-specific Nrf2 binding to a novel antioxidant response element locus in the Gclc promoter: a compensatory means for the loss of glutathione synthetic capacity in the ageing rat liver? *Ageing Cell* 11, 297-304.
- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., Suzuki, T., 2000. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* 25, 302-5.
- Simonsen, A., Cumming, R.C., Brech, A., Isakson, P., Schubert, D.R., Finley, K.D., 2008. Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*. *Autophagy* 4, 176-84.
- Sitte, N., Merker, K., Von Zglinicki, T., Davies, K.J., Grune, T., 2000. Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part II--aging of nondividing cells. *FASEB J.* 14, 2503-10.
- Sitte, N., Merker, K., Von Zglinicki, T., Grune, T., Davies, K.J., 2000. Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part I--effects of proliferative senescence. *FASEB J.* 14, 2495-502.
- Skaar, J.R., Pagano, M., 2009. Control of cell growth by the SCF and APC/C ubiquitin ligases. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 21, 816-24.

- Slack J.M.W., 2006. Βασικές αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης. Δεύτερη έκδοση.
- Smith, D.M., Chang, S.C., Park, S., Finley, D., Cheng, Y., Goldberg, A.L., 2007. Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Mol. Cell* 27, 731-44.
- Sorimachi, H., Ishiura, S., Suzuki, K., 1997. Structure and physiological function of calpains. *Biochem. J.* 328, 721-32.
- Sporn, M.B., Libby, K.T., 2012. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat. Rev. Cancer.* 12, 564-71.
- Stadtmueller, B.M., Kish-Trier, E., Ferrell, K., Petersen, C.N., Robinson, H., Myszka, D.G., Eckert, D.M., Formosa, T., Hill, C.P., 2012. Structure of a proteasome Pba1-Pba2 complex: implications for proteasome assembly, activation, and biological function. *J. Biol. Chem.* 287, 37371-82.
- Steffen, J., Seeger, M., Koch, A., Krüger, E., 2010. Proteasomal degradation is transcriptionally controlled by TCF11 via an ERAD-dependent feedback loop. *Mol. Cell* 40, 147-58.
- Stoebner, P.E., Lavabre-Bertrand, T., Henry, L., Guiraud, I., Carillo, S., Dandurand, M., Joujoux, J.M., Bureau, J.P., Meunier, L., 2005. High plasma proteasome levels are detected in patients with metastatic malignant melanoma. *Br. J. Dermatol.* 152, 948-53.
- Sun, F., Kanthasamy, A., Anantharam, V., Kanthasamy, A.G., 2009. Mitochondrial accumulation of polyubiquitinated proteins and differential regulation of apoptosis by polyubiquitination sites Lys-48 and -63. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 1632-43.
- Swanson, R., Locher, M., Hochstrasser, M., 2001. A conserved ubiquitin ligase of the nuclear envelope/endoplasmic reticulum that functions in both ER-associated and Matalpha2 repressor degradation. *Genes Dev.* 15, 2660-74.
- Sykiotis, G.P., Bohmann, D., 2008. Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in *Drosophila*. *Dev. Cell.* 14, 76-85.
- Sykiotis, G.P., Bohmann, D., 2010. Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Sci. Signal.* 3, re3. doi: 10.1126/scisignal.3112re3.
- Szlanka, T., Haracska, L., Kiss, I., Deák, P., Kurucz, E., Andó, I., Virágh, E., Udvardy, A., 2003. Deletion of proteasomal subunit S5a/Rpn10/p54 causes lethality, multiple mitotic defects and overexpression of proteasomal genes in *Drosophila melanogaster*. *J. Cell. Sci.* 116, 1023-33.
- Takahama, Y., Takada, K., Murata, S., Tanaka, K., 2012. β 5t-containing thymoproteasome: specific expression in thymic cortical epithelial cells and role in positive selection of CD8⁺ T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 24, 92-8.
- Takalo, M., Salminen, A., Soininen, H., Hiltunen, M., Haapasalo, A., 2013. Protein aggregation and degradation mechanisms in neurodegenerative diseases. *Am. J. Neurodegener. Dis.* 2, 1-14.
- Takeuchi, M., Yamagishi, S., 2009. Involvement of toxic AGEs (TAGE) in the pathogenesis of diabetic vascular complications and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 16, 845-58.
- Talens, R.P., Christensen, K., Putter, H., Willemsen, G., Christiansen, L., Kremer, D., Suchiman, H.E., Slagboom, P.E., Boomsma, D.I., Heijmans, B.T., 2012. Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Aging Cell* 11, 694-703.
- Tan, Z., Sun, X., Hou, F.S., Oh, H.W., Hilgenberg, L.G., Hol, E.M., van Leeuwen, F.W., Smith, M.A., O'Dowd, D.K., Schreiber, S.S., 2007. Mutant ubiquitin found in Alzheimer's disease causes neuritic beading of mitochondria in association with neuronal degeneration. *Cell. Death. Differ.* 14, 1721-32.
- Tanaka, A., Cleland, M.M., Xu, S., Narendra, D.P., Suen, D.F., Karbowski, M., Youle, R.J., 2010. Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J. Cell. Biol.* 191, 1367-80.
- Tanaka, K., Yoshimura, T., Tamura, T., Fujiwara, T., Kumatori, A., Ichihara, A., 1990. Possible mechanism of nuclear translocation of proteasomes. *FEBS Lett.* 271, 41-6.
- Taylor, E.B., Rutter, J., 2011. Mitochondrial quality control by the ubiquitin-proteasome system. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 1509-13.
- Terman, A., Gustafsson, B., Brunk, U.T., 2006. Mitochondrial damage and intralysosomal degradation in cellular aging. *Mol. Aspects Med.* 27, 471-482.
- Tijsterman, M., Plasterk, R.H., 2004. Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. *Cell* 117, 1-3.
- Todde, V., Veenhuis, M., van der Klei, I.J., 2009. Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1792, 3-13.
- Tomaru, U., Takahashi, S., Ishizu, A., Miyatake, Y., Gohda, A., Suzuki, S., Ono, A., Ohara, J., Baba, T., Murata, S., Tanaka, K., Kasahara, M., 2012. Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. *Am. J. Pathol.* 180, 963-72.
- Tomko, R.J. Jr., Hochstrasser, M., 2011. Order of the proteasomal ATPases and eukaryotic proteasome assembly. *Cell Biochem. Biophys.* 60, 13-20.

- Tonoki, A., Kuranaga, E., Tomioka, T., Hamazaki, J., Murata, S., Tanaka, K., Miura, M., 2009. Genetic evidence linking age-dependent attenuation of the 26S proteasome with the aging process. *Mol. Cell. Biol.* 29, 1095-106.
- Torres, C., Lewis, L., Cristofalo, V.J., 2006. Proteasome inhibitors shorten replicative life span and induce a senescent-like phenotype of human fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 207, 845-53.
- Torres, C.A., Perez, V.I., 2008. Proteasome modulates mitochondrial function during cellular senescence. *Free Radic Biol Med.* 44, 403-415.
- Trempe, J.F., Sauvé, V., Grenier, K., Seirafi, M., Tang, M.Y., Ménade, M., Al-Abdul-Wahid, S., Krett, J., Wong, K., Kozlov, G., Nagar, B., Fon, E.A., Gehring, K., 2013. Structure of parkin reveals mechanisms for ubiquitin ligase activation. *Science* 340, 1451-5.
- Trougakos, I.P., Saridaki, A., Panayotou, G., Gonos, E.S., 2006. Identification of differentially expressed proteins in senescent human embryonic fibroblasts. *Mech. Ageing Dev.* 127, 88-92.
- Trougakos, I.P., Sesti, F., Tsakiri, E., Gorgoulis, V.G., 2013. Non-enzymatic post-translational protein modifications and proteostasis network deregulation in carcinogenesis. *J. Proteomics.* 2013 Mar 14. doi:pii: S1874-3919(13)00100-0. 10.1016/j.jprot.2013.02.024.
- Tullet, J.M., Hertweck, M., An, J.H., Baker, J., Hwang, J.Y., Liu, S., Oliveira, R.P., Baumeister, R., Blackwell, T.K., 2008. Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. *Cell* 132, 1025-38.
- Ulrich, P., Cerami, A., 2001. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog. Horm. Res.* 56, 1-21.
- Uribarri, J., Cai, W., Sandu, O., Peppas, M., Goldberg, T., Vlassara, H., 2005. Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1043, 461-6.
- Ustrell, V., Hoffman, L., Pratt, G., Rechsteiner, M., 2002. PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. *EMBO J.* 21, 3516-25.
- van Leeuwen, F.W., de Kleijn, D.P., van den Hurk, H.H., Neubauer, A., Sonnemans, M.A., Sluijs, J.A., Köycü, S., Ramdijlal, R.D., Salehi, A., Martens, G.J., Grosveld, F.G., Peter, J., Burbach, H., Hol, E.M., 1998. Frameshift mutants of beta amyloid precursor protein and ubiquitin-B in Alzheimer's and Down patients. *Science* 279, 242-7.
- Van Raamsdonk, J.M., Hekimi, S., 2009. Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* 5, e1000361.
- Van Remmen, H., Ikeno, Y., Hamilton, M., Pahlavani, M., Wolf, N., Thorpe, S.R., Alderson, N.L., Baynes, J.W., Epstein, C.J., Huang, T.T., Nelson, J., Strong, R., Richardson, A., 2003. Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol. Genomics.* 16, 29-37.
- van Tijn, P., de Vrij, F.M., Schuurman, K.G., Dantuma, N.P., Fischer, D.F., van Leeuwen, F.W., Hol, E.M., 2007. Dose-dependent inhibition of proteasome activity by a mutant ubiquitin associated with neurodegenerative disease. *J. Cell. Sci.* 120, 1615-23.
- van Wijk, S.J., Timmers, H.T., 2010. The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins. *FASEB J.* 24, 981-93.
- Velentzas, P.D., Velentzas, A.D., Mpakou, V.E., Papassideri, I.S., Stravopodis, D.J., Margaritis, L.H., 2011. Proteasome inhibition induces developmentally deregulated programs of apoptotic and autophagic cell death during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Cell Biol Int.* 35, 15-27.
- Velentzas, P.D., Velentzas, A.D., Pantazi, A.D., Mpakou, V.E., Zervas, C.G., Papassideri, I.S., Stravopodis, D.J., 2013. Proteasome, but not autophagy, disruption results in severe eye and wing dysmorphia: a subunit- and regulator-dependent process in *Drosophila*. *PLoS One.* 8, e80530.
- Velichutina, I., Connerly, P.L., Arendt, C.S., Li, X., Hochstrasser, M., 2004. Plasticity in eucaryotic 20S proteasome ring assembly revealed by a subunit deletion in yeast. *EMBO J.* 23, 500-10.
- Veraksa, A., McGinnis, N., Li, X., Mohler, J., McGinnis, W., 2000. Cap 'n' collar B cooperates with a small Maf subunit to specify pharyngeal development and suppress deformed homeotic function in the *Drosophila* head. *Development* 127, 4023-4037.
- Vernace, V.A., Arnaud, L., Schmidt-Glenewinkel, T., Figueiredo-Pereira, M.E., 2007. Aging perturbs 26S proteasome assembly in *Drosophila melanogaster*. *FASEB J.* 21, 2672-82.
- Vilchez, D., Boyer, L., Morante, I., Lutz, M., Merkwirth, C., Joyce, D., Spencer, B., Page, L., Masliah, E., Berggren, W.T., Gage, F.H., Dillin, A., 2012. Increased proteasome activity in human embryonic stem cells is regulated by PSMD11. *Nature* 489, 304-8.
- Vilchez, D., Morante, I., Liu, Z., Douglas, P.M., Merkwirth, C., Rodrigues, A.P., Manning, G., Dillin, A., 2012. RPN-6 determines *C. elegans* longevity under proteotoxic stress conditions. *Nature* 489, 263-8.

- Villeneuve, N.F., Lau, A., Zhang, D.D., 2010. Regulation of the Nrf2-Keap1 antioxidant response by the ubiquitin proteasome system: an insight into cullin-ring ubiquitin ligases. *Antioxid. Redox. Signal.* 13, 1699-712.
- Voglauer, R., Chang, M.W., Dampier, B., Wieser, M., Baumann, K., Sterovsky, T., Schreiber, M., Katinger, H., Grillari, J., 2006. SNEV overexpression extends the life span of human endothelial cells. *Exp. Cell. Res.* 312, 746-59.
- von Mikecz, A., 2006. The nuclear ubiquitin-proteasome system. *J. Cell. Sci.* 119, 1977-84.
- Walter, J., Urban, J., Volkwein, C., Sommer, T., 2001. Sec61p-independent degradation of the tail-anchored ER membrane protein Ubc6p. *EMBO J.* 20, 3124-31.
- Walz, J., Erdmann, A., Kania, M., Typke, D., Koster, A.J., Baumeister, W., 1998. 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 121, 19-29.
- Wang, X., Yen, J., Kaiser, P., Huang, L., 2010. Regulation of the 26S proteasome complex during oxidative stress. *Sci Signal.* 3, ra88. doi: 10.1126/scisignal.2001232.
- Wang, S., Kaufman, R.J., 2012. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J. Cell. Biol.* 197, 857-67.
- Wang, X.J., Yu, J., Wong, S.H., Cheng, A.S., Chan, F.K., Ng, S.S., Cho, C.H., Sung, J.J., Wu, W.K., 2013. A novel crosstalk between two major protein degradation systems: Regulation of proteasomal activity by autophagy. *Autophagy* 9, 10. [Epub ahead of print]
- Warrick, J.M., Morabito, L.M., Bilen, J., Gordesky-Gold, B., Faust, L.Z., Paulson, H.L., Bonini, N.M., 2005. Ataxin-3 suppresses polyglutamine neurodegeneration in *Drosophila* by a ubiquitin-associated mechanism. *Mol. Cell* 18, 37-48.
- Wautier, M. P., Chappey, O., Corda, S., Stern, D. M., Schmidt, A. M., Wautier, J. L., 2001. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280:E685-E695.
- Weniger, M.A., Rizzatti, E.G., Pérez-Galán, P., Liu, D., Wang, Q., Munson, P.J., Raghavachari, N., White, T., Tweito, M.M., Dunleavy, K., Ye, Y., Wilson, W.H., Wiestner, A., 2011. Treatment-induced oxidative stress and cellular antioxidant capacity determine response to bortezomib in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* 17, 5101-5112.
- Whitby, F.G., Masters, E.I., Kramer, L., Knowlton, J.R., Yao, Y., Wang, C.C., Hill, C.P., 2000. Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature* 408, 115-20.
- Willer, M., Forte, G.M., Stirling, C.J., 2008. Sec61p is required for ERAD-L: genetic dissection of the translocation and ERAD-L functions of Sec61P using novel derivatives of CPY. *J. Biol. Chem.* 283, 33883-8.
- Winborn, B.J., Travis, S.M., Todi, S.V., Scaglione, K.M., Xu, P., Williams, A.J., Cohen, R.E., Peng, J., Paulson, H.L., 2008. The deubiquitinating enzyme ataxin-3, a polyglutamine disease protein, edits Lys63 linkages in mixed linkage ubiquitin chains. *J. Biol. Chem.* 283, 26436-43.
- Xie, Y., Varshavsky, A., 2001. RPN4 is a ligand, substrate, and transcriptional regulator of the 26S proteasome: a negative feedback circuit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98, 3056-61.
- Xing, Y., Jameson, S.C., Hogquist, K.A., 2013. Thymoproteasome subunit-β5T generates peptide-MHC complexes specialized for positive selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 110, 6979-84.
- Xu, H., Fu, J., Ha, S.W., Ju, D., Zheng, J., Li, L., Xie, Y., 2012. The CCAAT box-binding transcription factor NF-Y regulates basal expression of human proteasome genes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1823, 818-25.
- Xu, S., Peng, G., Wang, Y., Fang, S., Karbowski, M., 2011. The AAA-ATPase p97 is essential for outer mitochondrial membrane protein turnover. *Mol. Biol. Cell.* 22, 291-300.
- Xu, P., Duong, D.M., Seyfried, N.T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D., Peng, J., 2009. Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* 137, 133-45.
- Yamagishi, S., Inagaki, Y., Okamoto, T., Amano, S., Koga, K., Takeuchi, M., et al., 2002. Advanced glycation end products induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor in bovine retinal pericytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 973-978.
- Yashiroda, H., Mizushima, T., Okamoto, K., Kameyama, T., Hayashi, H., Kishimoto, T., Niwa, S., Kasahara, M., Kurimoto, E., Sakata, E., Takagi, K., Suzuki, A., Hirano, Y., Murata, S., Kato, K., Yamane, T., Tanaka, K., 2008. Crystal structure of a chaperone complex that contributes to the assembly of yeast 20S proteasomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 228-36.
- Ye, Y., Shibata, Y., Yun, C., Ron, D., Rapoport, T.A., 2004. A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* 429, 841-7.
- Yin, D., 1996. Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Radic. Biol. Med.* 21, 871-888.

- Yonashiro, R., Ishido, S., Kyo, S., Fukuda, T., Goto, E., Matsuki, Y., Ohmura-Hoshino, M., Sada, K., Hotta, H., Yamamura, H., Inatome, R., Yanagi, S., 2006. A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics. *EMBO J.* 25, 3618-26.
- Yoshii, S.R., Kishi, C., Ishihara, N., Mizushima, N., 2011. Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem.* 286, 19630-40.
- Youle, R.J., Narendra, D.P., 2011. Mechanisms of mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 9-14.
- Zainal, T.A., Oberley, T.D., Allison, D.B., Szveda, L.I., Weindruch, R., 2000. Caloric restriction of rhesus monkeys lowers oxidative damage in skeletal muscle. *FASEB J.* 14, 1825-36.
- Zhang, F., Su, K., Yang, X., Bowe, D.B., Paterson, A.J., Kudlow, J.E., 2003. O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. *Cell* 115, 715-25.
- Zhang, Y., 2003. Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. *Genes Dev.* 17, 2733-40.
- Zhang, Y., Ikeno, Y., Qi, W., Chaudhuri, A., Li, Y., Bokov, A., Thorpe, S.R., Baynes, J.W., Epstein, C., Richardson, A., Van Remmen, H., 2009. Mice deficient in both Mn superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 have increased oxidative damage and a greater incidence of pathology but no reduction in longevity. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 64, 1212-20.
- Zhong, L., Belote, J.M., 2007. The testis-specific proteasome subunit Prosalpha6T of *D. melanogaster* is required for individualization and nuclear maturation during spermatogenesis. *Development* 134, 3517-25.
- Zhong, Q., Gao, W., Du, F., Wang, X., 2005. Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* 121, 1085-1095.
- Zhu, Y.X., Tiedemann, R., Shi, C.X., Yin, H., Schmidt, J.E., Bruins, L.A., Keats, J.J., Braggio, E., Sereduk, C., Mousses, S., Stewart, A.K., 2011. RNAi screen of the druggable genome identifies modulators of proteasome inhibitor sensitivity in myeloma including CDK5. *Blood* 117, 3847-3857.
- Ziviani, E., Tao, R.N., Whitworth, A.J., 2010. *Drosophila* parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates mitofusin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 107, 5018-23.
- Zong, C., Young, G.W., Wang, Y., Lu, H., Deng, N., Drews, O., Ping, P., 2008. Two-dimensional electrophoresis-based characterization of post-translational modifications of mammalian 20S proteasome complexes. *Proteomics* 8, 5025-37.

7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η γήρανση είναι μία αναπόφευκτη διαδικασία σχεδόν για όλους τους οργανισμούς. Η εμφάνισή της σχετίζεται με τη σταδιακή συσσώρευση βλαβών κατά τη διάρκεια της ζωής, στις οποίες συμβάλλουν τόσο γενετικοί όσο και στοχαστικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες. Αρκετά μονοπάτια έχουν εμπλακεί στην εξέλιξη της γήρανσης, κάποια από τα οποία είναι τα μεταβολικά μονοπάτια σηματοδότησης, το μονοπάτι των σιρτουϊνών (sirtuins), οι επιγενετικές τροποποιήσεις, η μείωση του μήκους των τελομερών, καθώς και τα μονοπάτια απόκρισης στο στρες. Επίσης, κατά τη γήρανση παρατηρείται αύξηση των μη ενζυματικών τροποποιήσεων των πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα οι οξειδωτικές τροποποιήσεις και οι τροποποιήσεις των πρωτεϊνών με σάκχαρα [τα λεγόμενα τελικά προϊόντα πρωτεϊνικής γλυκοζυλίωσης (Advanced Glycation End products)-AGEs]. Αυτές οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις οδηγούν στη δυσλειτουργία των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την αύξηση της πρωτεωμικής αστάθειας που μπορεί να οδηγήσει στην επιτάχυνση της γήρανσης, καθώς και στην εμφάνιση ασθενειών που σχετίζονται με το γήρας.

Τα κυριότερα σηματοδοτικά μονοπάτια διατήρησης της πρωτεωμικής σταθερότητας είναι το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος, το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος, καθώς και το κύριο σηματοδοτικό μονοπάτι αντι-οξειδωτικής απόκρισης Nrf2/Keap1. Το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος συμμετέχει στην αποικοδόμηση ουβικιτινωμένων φυσιολογικών πρωτεϊνών με μικρό χρόνο ημιζωής, καθώς και μη λειτουργικών πρωτεϊνών τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτοσόλιο, καθώς επίσης και στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο μιτοχόνδριο. Επίσης, φαίνεται πως το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος «συνομιλεί» (αν και ο μοριακός μηχανισμός παραμένει άγνωστος) με το μονοπάτι της αυτοφαγίας, καθώς και με το σηματοδοτικό μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης Nrf2/Keap1.

Έχει παρατηρηθεί μείωση της ενεργότητας του πρωτεασώματος κατά την κυτταρική και την *in vivo* γήρανση. Επομένως, το πρωτεάσωμα συμβάλλει στη μοριακή διαδικασία της εμφάνισης και της εξέλιξης της γήρανσης, χωρίς επίσης, να είναι ξεκάθαρο πως ακριβώς συμβαίνει αυτό. Για το σκοπό αυτό είναι σημαντικό να μελετηθούν οι μεταβολές στην ομοιοστασία του πρωτεώματος, καθώς και να αναλυθεί ο βιολογικός ρόλος των κύριων πρωτεολυτικών συστημάτων κατά τη γήρανση. Επίσης, απαιτείται να πραγματοποιηθεί μια συστηματική ανάλυση των *in vivo* μοριακών μεταβολών μετά από γονιδιακή αποσιώπηση (RNAi) των διαφόρων πρωτεασωματικών υπομονάδων. Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα AGEs και οι οξειδωμένες πρωτεΐνες συσσωρεύονται κατά το γήρας και καθώς τα AGEs βρίσκονται σε αρκετά τρόφιμα η μελέτη της *in vivo* επίδρασής τους στον οργανισμό παρουσιάζει επίσης ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Σκοπός της παρούσας μελέτης υπήρξε η διερεύνηση όλων των παραπάνω ερωτημάτων *in vivo*, στο πειραματικό μοντέλο *Drosophila melanogaster*. Η *Drosophila* είναι ιδανική για

τέτοιου είδους μελέτες, καθώς το πρωτεάσωμα της είναι όμοιο με αυτό των θηλαστικών, συνδυάζει τόσο μετα-μιτωτικά όσο και μιτωτικά κύτταρα, ενώ μια σειρά από μεταβολικά μονοπάτια (συμπεριλαμβανομένου του μονοπατιού Nrf2/Kear1) είναι παρόμοια με αυτά των θηλαστικών.

Τα ευρήματά μας έδειξαν τη δυσλειτουργία του πρωτεασώματος, τη συσσώρευση ουβικιτινιωμένων, οξειδωμένων πρωτεϊνών, καθώς και πρωτεϊνών που έχουν τροποποιηθεί με AGEs σε όλους τους σωματικούς ιστούς των εντόμων κατά την *in vivo* γήρανση. Επίσης, βρέθηκε ότι οι ωοθήκες και σπερματοθήκες των εντόμων είναι πιο ανθεκτικές σε σχέση με το σωματικό ιστό τόσο στις βλάβες που υπόκειται ο οργανισμός κατά την *in vivo* γήρανση όσο και στο εξωγενές οξειδωτικό στρες, αλλά και ενδεχομένως στη μερική αναστολή του πρωτεασώματος. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η καταστολή της έκφρασης βασικών πρωτεασωμικών υπομονάδων διαταράσσει την αυτοσυγκρότηση του πρωτεασώματος και δεδομένου ότι (όπως διαπιστώθηκε και στην παρούσα μελέτη) οδηγεί σε θνησιμότητα σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, αναπτύχθηκε ένα φαρμακολογικό μοντέλο όπου οι μοριακές αλλαγές λόγω υπο-λειτουργίας του πρωτεασώματος μελετήθηκαν μετά από χορήγηση ειδικών πρωτεασωμικών αναστολέων. Παρατηρήθηκε ότι η μείωση της ενεργότητας του πρωτεασώματος στα νεαρά έντομα στα επίπεδα που παρατηρούνται σε γηρασμένα άτομα προκαλεί διαταραχή της πρωτεόστασης, μείωση της μυϊκής δύναμης των εντόμων και τελικά δοσο-εξαρτώμενη μείωση του προσδόκιμου ζωής. Επίσης, η υπολειτουργία της πρωτεασωμικής ενεργότητας σε νεαρά έντομα οδήγησε στη δοσο-εξαρτώμενη επαγωγή της γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης του πρωτεασώματος, καθώς και των αυτοσυγκροτημένων πρωτεασωμάτων. Η επαγωγή της έκφρασης του πρωτεασώματος στους σωματικούς ιστούς δεν παρατηρήθηκε, όταν γηρασμένα έντομα εκτέθηκαν στους πρωτεασωμικούς αναστολείς σε αντίθεση με τις ωοθήκες και σπερματοθήκες που διατήρησαν την ικανότητα επαγωγής της έκφρασης του πρωτεασώματος τόσο κατά τη γήρανση όσο και μετά από δυσλειτουργία του πρωτεασώματος. Ακόμα, βρέθηκε ότι η υπολειτουργία του πρωτεασώματος οδηγεί σε αύξηση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) και του H₂O₂ στους νεαρούς αλλά όχι γηρασμένους σωματικούς ιστούς, καθώς και ότι η παραγωγή ROS σηματοδοτεί την επαγωγή της έκφρασης του πρωτεασώματος. Στη συνέχεια, διαπιστώθηκε ότι η πρωτεασωμική δυσλειτουργία προκαλεί διαταραχή της ομοιοστασίας των μιτοχονδρίων, δυσλειτουργία της ηλεκτρικής αφυδρογόνωσης, καθώς και του μιτοχονδριακού συμπλέγματος II/III, γεγονός που συνάδει με την παρατηρούμενη αύξηση των ROS. Επίσης, με τη χρήση διαγονιδιακών εντόμων διαπιστώθηκε ότι η πρωτεασωμική δυσλειτουργία επάγει την αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου στους σωματικούς ιστούς των νεαρών (αλλά όχι των γηρασμένων) εντόμων ενώ στις γονάδες παρατηρήθηκε επαγωγή των αντιοξειδωτικών μονοπατιών ανεξαρτήτως ηλικίας. Καθώς το κύριο μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης είναι το μονοπάτι Nrf2/Kear1,

ελέγξαμε αν σχετίζεται με την επαγωγή του πρωτεασώματος μετά από πρωτεασωμική δυσλειτουργία. Η μελέτη μας έδειξε ότι η επαγωγή του πρωτεασώματος μετά από πρωτεασωμική δυσλειτουργία σε νεαρά έντομα διαμεσολαβείται από τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 στη *Drosophila*. Ακόμη, η παροδική υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 σε νεαρά αλλά και σε γηρασμένα έντομα οδήγησε στην αύξηση της έκφρασης και ενεργότητας του πρωτεασώματος, καθώς και σε αυξημένη ανθεκτικότητα σε σύντομο πρωτεοτοξικό στρες. Βρέθηκε επίσης ότι η μακροχρόνια ενεργοποίηση του Nrf2 οδηγεί σε μείωση του προσδόκιμου ζωής. Η παρατήρηση αυτή δεικνύει ότι η παρατεταμένη ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής απόκρισης είναι επιβλαβής για τον οργανισμό. Επομένως, φαίνεται πως μόνο η ήπια παροδική ενεργοποίηση των συστημάτων διατήρησης της πρωτεόστασης είναι ωφέλιμη για τον οργανισμό.

Στη συνέχεια, μελετήθηκαν διαγονιδιακά έντομα που είχαν κατεσταλμένη την έκφραση των πρωτεασωμικών υπομονάδων β1, β5, α4, α7, Rpn11, Rpn6, Rpn10 και Rpt6. Το εύρημα ότι η μείωση της έκφρασης των υπομονάδων β5, α7, Rpn11 και Rpn6 προκαλεί θνησιμότητα στο στάδιο της λάρβας-προνύμφης, καθώς και επαγωγή της έκφρασης των υπόλοιπων πρωτεασωμικών υπομονάδων επιβεβαίωσε τις φαινοτυπικές μεταβολές που παρατηρήθηκαν μετά από επίδραση σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια με τον πρωτεασωμικό αναστολέα PS-341. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το εύρημα ότι η καταστολή των υπομονάδων α4, β1, Rpn10 και Rpt6 επιτρέπει μεν τη εκκόλαψη του ενήλικου εντόμου, αλλά όταν τα ενήλικα έντομα μεταφέρθηκαν σε συνθήκες επαγωγής του διαγονιδίου εμφάνισαν μείωση του προσδόκιμου ζωής με εντονότερο φαινότυπο πρώιμης γήρανσης σε συνθήκες καταστολής της πρωτεασωμικής υπομονάδας Rpt6. Το αποτέλεσμα αυτό δεικνύει ότι η απουσία των υπομονάδων αυτών επιτρέπει τη συντήρηση της πρωτεασωμικής λειτουργίας ή ότι η μειωμένη τους έκφραση εξισορροπείται από άλλες υπομονάδες/πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, το εύρημα ότι η καταστολή της α4 υπομονάδας δεν προκαλεί ραγδαία αύξηση της θνησιμότητας, πιθανώς να, εξηγείται από την παρατήρηση ότι η α4 και η α3 υπομονάδες φαίνεται να έχουν παρόμοια λειτουργία.

Όπως αναφέρθηκε, οι *in vivo* επιδράσεις των μη ενζυματικά τροποποιημένων πρωτεϊνών AGEs ή της λιποφουσκίνης στη φυσιολογία του οργανισμού παρέμεναν άγνωστες. Η διατροφή στις δυτικές χώρες είναι αρκετά πλούσια σε AGEs, τα οποία σε μεγάλες συγκεντρώσεις συμβάλλουν στην αύξηση του οξειδωτικού στρες, καθώς και σε φλεγμονώδεις καταστάσεις. Παρομοίως, τόσο η *in vivo* όσο και η κυτταρική γήρανση συνοδεύονται από την ενδοκυτταρική συσσώρευση της λιποφουσκίνης στα λυσοσώματα. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, οι μελέτες μας έδειξαν ότι η κατανάλωση τροφής εμπλουτισμένης σε AGEs ή λιποφουσκίνη οδήγησε σε διαταραχή της πρωτεόστασης και σε δυσλειτουργία του πρωτεασώματος, καθώς και αύξηση του οξειδωτικού στρες. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αύξηση της ενεργότητας των λυσοσωμικών καθεσινών, ενώ όταν εκτέθηκαν

διαγονιδιακά έντομα που είχαν κατασταλασμένη (μέσω RNAi) την ενεργότητα των καθεψινών σε τροφή εμπλουτισμένης σε AGEs ή λιποφουσκίνη εμφάνισαν πρόωμη γήρανση. Η παρατήρηση αυτή δεικνύει ότι οι λυσοσωμικές καθεψίνες έχουν κομβικό ρόλο στην αποικοδόμηση πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων.

Συνοπτικά, οι μελέτες της παρούσας ΔΔ υποστηρίζουν με πειραματικά ευρήματα την (εξελικτική) θεωρία του *φθαρτού σώματος* (Disposable soma theory), σύμφωνα με την οποία το σώμα είναι απαραίτητο μόνο για να διατηρεί ασφαλές το αναπαραγωγικό σύστημα, το οποίο γηράσκει με σχετικά αργούς ρυθμούς. Επίσης, για πρώτη φορά δείχθηκε σε *in vivo* συνθήκες ότι τόσο η διαφορική ρύθμιση του πρωτεασώματος κατά τη γήρανση όσο και η ιστοειδική ρύθμιση του πρωτεασώματος υπό συνθήκες μειωμένης ενζυμικής ενεργότητας εξαρτώνται από το μονοπάτι σηματοδότησης Nrf2/Keap1. Επιπλέον, φαίνεται να υπάρχει διαφορική βαρύτητα των πρωτεασωμικών υπομονάδων όσον αφορά στην αυτοσυγκρότηση του πρωτεασώματος, την πρωτεασωμική λειτουργία και τελικά τη διατήρηση της ομοιοδυναμικής του κυττάρου. Τέλος, μια δίαιτα πλούσια σε AGEs ή λιποφουσκίνη επιταχύνει την εμφάνιση του γήρατος και, έτσι, πιθανολογούμε ότι η περιορισμένη κατανάλωση τροφών πλούσιων σε AGEs ή λιποφουσκίνη μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του προσδόκιμου ζωής και/ή σε επιβράδυνση του ρυθμού των ασθενειών του γήρατος.

8. ABSTRACT

8. ABSTRACT

Organismal ageing is a multifactorial process modulated by the interplay between genetic and environmental factors, and it affects most, if not all, tissues and organs of the body. At the tissue level, ageing-related damage of biomolecules affects all types of cells and the extracellular matrix. The clearance of proteome damage is achieved via the occurrence of a complex and highly regulated network of effective surveillance, maintenance, and clearance systems that ensure biomolecules' functionality, thus preventing disruption of organism homeostasis. Key players in preventing the breakdown of cellular proteostasis (homeostasis of the proteome) are the molecular chaperones, the oxidized protein repair enzymes MsrA and MsrB, the mitochondrial Lon protease, and the two main proteolytic systems (i.e., the lysosome and the proteasome), along with main antioxidant signaling pathway NFE2-related factor 2 (Nrf2)/Keap1.

Proteasome is central to proteostasis maintenance, as it degrades both normal and damaged proteins. Herein, we undertook a detailed analysis of proteasome function and regulation in the *in vivo* setting of *Drosophila melanogaster*. We report that a major hallmark of somatic tissues of ageing flies is the gradual accumulation of ubiquitinated and carbonylated proteins; these effects correlated with a 50% reduction of proteasome expression and catalytic activity. In contrast, gonads of ageing flies were relatively free of proteome oxidative damage and maintained substantial proteasome expression levels and highly active proteasomes. Moreover, gonads of young flies were found to possess more abundant and more active proteasomes than somatic tissues. Exposure of flies to oxidants induced higher proteasome activities specifically in the gonads, which were, independently of age, more resistant than soma to oxidative challenge and, as analyses in reporter transgenic flies showed, retained functional antioxidant responses. Finally, inducible Nrf2 activation in transgenic flies promoted youthful proteasome expression levels in the aged soma, suggesting that age-dependent Nrf2 dysfunction is causative to decreasing somatic proteasome expression during ageing.

As the impact of *in vivo* proteasome dysfunction on the proteostasis networks and ageing processes remain poorly understood, our study then was focused to this issue. We found that RNAi-mediated knock down of 20S proteasome subunits in *Drosophila melanogaster* resulted in larval lethality. We therefore studied the molecular effects of proteasome dysfunction in adult flies by developing a model of dose-dependent pharmacological proteasome inhibition. Impaired proteasome function promoted several “old-age” phenotypes and markedly reduced flies' lifespan. In young somatic tissues and in gonads of all ages, loss of proteasome activity induced higher expression levels and assembly rates of proteasome subunits. Proteasome dysfunction was signaled to the proteostasis network by reactive oxygen species (ROS) that

originated from malfunctioning mitochondria and triggered an Nrf2-dependent upregulation of the proteasome subunits. RNAi-mediated Nrf2 knock down reduced proteasome activities, flies resistance to stress, as well as longevity. Conversely, inducible activation of Nrf2 in transgenic flies, upregulated basal proteasome expression and activity independently of age, and conferred resistance to proteotoxic stress. Interestingly, prolonged Nrf2 over-expression reduced longevity, indicating that excessive activation of the proteostasis pathways can be detrimental.

We then studied transgenic flies where the proteasomal subunits $\beta 1$, $\beta 5$, $\alpha 4$, $\alpha 7$, Rpn11, Rpn6, Rpn10 and Rpt6 expression was suppressed by RNAi. We found that reduced expression of the $\beta 5$, $\alpha 7$, Rpn11 and Rpn6 subunits caused larval lethality. Also, we noted the upregulation of proteasome subunits completely phenocopying thus the phenotypes observed with PS-341. Interestingly, the finding that RNAi-mediated suppression of the subunits $\alpha 4$, $\beta 1$, Rpn10 and Rpt6 allowed hatching of the adult fly indicates that some proteasome subunits can be substituted allowing thus partial maintenance of proteasome function. In support, the finding that suppression of $\alpha 4$ subunit expression does not cause significant increase in mortality is likely explained by a previous report showing that the $\alpha 4$ and $\alpha 3$ subunits exert similar functions. Nevertheless, the reduced longevity of these flies clearly indicates the absence of fully functional proteasomes.

Finally, considering that the advanced glycation end product (AGEs)-modified proteins (a non-enzymatic glycation of free amino groups of proteins) along with lipofuscin (a highly oxidized aggregate of covalently cross-linked proteins, sugars and lipids) have been found to accumulate during ageing and in several age-related diseases, we studied the impact of oral administration of glucose (Glc)-, fructose (Frc)-, or ribose (Rib)-modified albumin or of artificial lipofuscin (LF) in our *in vivo* screening platform, namely *Drosophila*. We report that continuous feeding of young *Drosophila* flies with culture medium enriched in AGEs or in lipofuscin resulted in reduced locomotor performance, in accelerated rates of AGEs-modified proteins and carbonylated proteins accumulation in the somatic tissues and the haemolymph of flies, as well as in a significant reduction of flies healthspan and lifespan. These phenotypic effects were accompanied with reduced proteasome peptidase activities in both the haemolymph and in somatic tissues of flies and higher levels of oxidative stress and proteasome expression levels; furthermore, oral administration of AGEs or lipofuscin in flies triggered an upregulation of the lysosomal cathepsins B, L activities. Finally, RNAi-mediated cathepsin D knockdown reduced flies longevity and significantly augmented the deleterious effects of AGEs and lipofuscin indicating that lysosomal cathepsins reduce the toxicity of diet-derived AGEs or lipofuscin.

In conclusion, the present PhD Thesis provides novel evidence supporting differential regulation of proteostasis maintenance and proteome clearance in the young organism, during

ageing, or in response to oxidative challenge in the somatic tissues and the gonads of *Drosophila*. Also, our findings support experimentally the trade-off theories of ageing evolution, where ageing is considered a consequence of increased energetic investment in germ line (that preserves viability across generations) over soma (only needed to support survival of a single generation) maintenance. Moreover, our *in vivo* studies add new knowledge on the proteotoxic stress-related regulation of the proteostasis networks in higher metazoans. Proteasome dysfunction triggers the activation of an Nrf2-dependent tissue- and age-specific regulatory circuit aiming to adjust the cellular proteasome activity according to temporal and/or spatial proteolytic demands. Prolonged deregulation of this proteostasis circuit accelerates ageing. Finally, our *in vivo* studies demonstrate that chronic ingestion of AGEs or lipofuscin disrupts proteostasis and accelerates the organismal functional decline that occurs during normal ageing.

9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι: ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΜΑΚΡΟΒΙΟΤΗΤΑΣ

Sample	Genotype	Mean Lifespan (LF) +/- s.e.m. (Days)	Median Lifespan +/- s.e.m. (Days)	% Median LF vs. control	Max (Days)	Log Rank P Value						Total Animals Died/Total	
								Control	1.7% H ₂ O ₂	3.3% H ₂ O ₂	10 mM t-BHP	20 mM t-BHP	
Control	wild type	50,770	1,748	52,000	3,905	100.00	72		.000	.000	.000	.000	61/62
1.7% H ₂ O ₂		5,633	.252	6,000	.177	11.54	11	.000		.000	.000	.067	60/60
3.3% H ₂ O ₂		3,833	.180	3,000	.242	5.77	7	.000	.000		.000	.000	60/60
10 mM t-BHP		9,083	.360	8,000	.704	11.38	16	.000	.000	.000		.000	60/60
20 mM t-BHP		6,367	.260	6,000	.148	11.54	14	.000	.067	.000	.000		60/60

Πίνακας 1

P < 0.01

Figure	Sample	Genotype	Mean Lifespan (LF) $\pm$ s.e.m. (Days)		Median LF $\pm$ s.e.m. (Days)		% Median LF vs. control	Max LF (Days)	Log Rank P Value							Total Animals Died/Total
1E	Control	wild type	50.24	1.77	51	3.46	100.00	72	Control	0.5 μ M PS-341	1 μ M PS-341	5 μ M PS-341	10 μ M PS-341	20 μ M PS-341		
	0.5 μ M PS-341	wild type	32.19	1.48	28	3.01	54.90	58	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	59/60
	1 μ M PS-341	wild type	21.17	0.35	21	0.29	41.17	26	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	56/60
	5 μ M PS-341	wild type	9.63	0.20	10	0.22	19.60	13	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	60/60
	10 μ M PS-341	wild type	8.37	0.18	9	0.10	17.60	11	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	60/60
	20 μ M PS-341	wild type	6.98	0.10	7	0.08	13.70	8	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	60/60
6E									CncC RNAi RU486 (-)	CncC RNAi RU486 (+)						
	CncC RNAi RU486 (-)	(II)UAS-CncC RNAi/ tubGS10Gal4 ; (III)WizC/+	39.93	2.19	44	4.22	100.00	68	.000							74/83
	CncC RNAi RU486 (+)	(II)UAS-CncC RNAi/ tubGS10Gal4 ; (III)WizC/+	19.01	0.60	19	0.72	43.18	32	.000							124/138
S7A									Control	0.5 μ M PS-341 (post-fertilization)						
	Control	wild type	45.10	1.63	46	1.13	100.00	67	.069	.069						58/60
	0.5 μ M PS-341 (post-fertilization)	wild type	43.17	1.28	42	3.14	91.30	57	.069							49/60
S7B									Control	5 μ M PS-341 (gametogenesis)	10 μ M PS-341 (gametogenesis)	20 μ M PS-341 (gametogenesis)				
	Control	wild type	50.39	2.38	51	4.67	100.00	66	.030	.030	.315	.001				26/30
	5 μ M PS-341 (gametogenesis)	wild type	42.90	3.18	53	3.91	103.90	58	.030	.008	.008	.008				28/30
	10 μ M PS-341 (gametogenesis)	wild type	51.14	2.05	56	0.85	109.80	63	.315	.008	.000	.000				28/30
	20 μ M PS-341 (gametogenesis)	wild type	41.26	1.93	44	4.12	86.27	56	.001	.008	.000					25/30
S8C									Control	1 μ M PS-341	1 μ M PS-341/ 2.5 mM Tiron	1 μ M PS-341/ 5 mM Tiron	1 μ M PS-341/ 10 mM Tiron			
	Control	wild type	47.74	1.57	48	1.53	100.00	72	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	79/80
	1 μ M PS-341	wild type	17.41	0.39	17	0.49	35.41	24	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	79/80
	1 μ M PS-341/ 2.5 mM Tiron	wild type	27.87	1.03	30	1.17	62.50	47	.000	.000	.013	.000	.000	.000	.000	81/83
	1 μ M PS-341/ 5 mM Tiron	wild type	24.23	1.11	23	1.05	47.91	42	.000	.000	.013	.007	.007	.007	.007	61/78
	1 μ M PS-341/ 10 mM Tiron	wild type	21.00	0.69	23	1.11	47.91	31	.000	.000	.000	.007	.007	.007	.007	78/87
S11E									(II)UAS CncC/+ ; (III) tubGS5Gal4/+ RU486 (-)	(II)UAS CncC/+ ; (III) tubGS5Gal4/+ RU486 (+)	(III) ; UAS CncC/tubGS5Gal4 RU486 (-)	(III) ; UAS CncC/tubGS5Gal4 RU486 (+)				
	(II)UAS CncC/+ ; (III) tubGS5Gal4/+ RU486 (-)	(II)UAS CncC/+ ; (III) tubGS5Gal4/+	46.51	1.64	50	2.69	100.00	75	.000	.000	.0721	.000	.000	.000	.000	142/167
	(II)UAS CncC/+ ; (III) tubGS5Gal4/+ RU486 (+)	(II)UAS CncC/+ ; (III) tubGS5Gal4/+	16.98	0.51	16	0.44	32.00	34	0.000	.000	.000	.000	.0245	.000	.000	180/204
	(III) ; UAS CncC/tubGS5Gal4 RU486 (-)	(III) ; UAS CncC/tubGS5Gal4	49.06	1.36	52	1.51	100.00	76	0.721	.000	.000	.000	.000	.000	.000	154/179
	(III) ; UAS CncC/tubGS5Gal4 RU486 (+)	(III) ; UAS CncC/tubGS5Gal4	16.36	0.55	16	0.75	30.76	31	0.000	0.245	.000	.000	.000	.000	.000	142/159
S12D									Keap1 RNAi RU486 (-)	Keap1 RNAi RU486 (+)						
	Keap1 RNAi RU486 (-)	(II)UAS-keap1 RNAi/+ ; (III)UAS-keap1 RNAi/ tubGS5Gal4	41.32	1.10	44	2.40	100.00	68	.000	.000						191/224
	Keap1 RNAi RU486 (+)	(II)UAS-keap1 RNAi/+ ; (III)UAS-keap1 RNAi/ tubGS5Gal4	26.96	0.479	27	1.03	61.36	42	.000							212/250

Πίνακας 2
P < 0.01

Sample	Genotype	Mean Lifespan (LF) +/- s.e.m. (Days)		Median Lifespan +/- s.e.m. (Days)		% Median LF vs. control	Max (Days)	Log Rank P Value		Total Animals Died/Total
								RU486 (-)	RU486 (+)	
RNAi Rpn10 RU486 (-)		38,266	1,279	39	1,374	100.00	65		0.000	111/117
RNAi RPN10 RU486 (+)		21,832	0.774	22	1,116	56.41	34	0.000		101/101
								RU486 (-)	RU486 (+)	
RNAi Rpt6 RU486 (-)		41,086	2,253	45	5,083	100.00	76		0.000	98/117
RNAi Rpt6 RU486 (+)		13,820	0.842	11	0.661	24.44	33	0.000		97/101
								RU486 (-)	RU486 (+)	
RNAi b1 RU486 (-)		37,705	2,348	39	3,700	100.00	64		0.080	63/70
RNAi b1 RU486 (+)		33,476	2,476	36	5,178	92.31	60	0.080		53/70
								RU486 (-)	RU486 (+)	
RNAi a4 RU486 (-)		35,128	1,665	38	2,835	100.00	57		0.000	62/70
RNAi a4 RU486 (+)		26,587	1,293	28	1,967	73.68	46	0.000		79/87

Πίνακας 3

P < 0.01

Figure	Sample	Genotype	Mean Lifespan (LF) +/- s.e.m. (Days)		Median Lifespan +/- s.e.m. (Days)		% Median LF vs. control	Max (Days)	Log Rank P Value						Total Animals Died/Total
2A1									Control	Glc					
	Control	wild type	44.64	1.84	46	2.33	100.00	72		0.000					89/100
	Glc		31.72	1.30	32	0.86	69.56	56	0.000						95/100
2A2									Control	Frc					
	Control	wild type	46.04	1.89	48	3.23	100.00	72		0.000					86/90
	Frc		39.21	1.46	41	2.56	85.41	67	0.000						95/110
2A3									Control	Rib					
	Control	wild type	46.99	1.68	49	3.04	100.00	72		0.000					98/100
	Rib		35.94	1.34	38	1.97	77.55	68	0.000						109/120
2B									Control	LF					
	Control	wild type	45.83	1.60	48	2.42	100.00	72		0.000					100/120
	LF		30.61	1.49	32	1.21	66.66	61	0.000						78/90
6		RNAi CathD							RNAi cathD RU486 (-)	RNAi cathD RU486 (+)	RNAi cathD RU486 (-) / Rib	RNAi cathD RU486 (+) / Rib	RNAi cathD RU486 (-) / LF	RNAi cathD RU486 (+) / LF	
	RNAi cathD RU486 (-)		50.08	1.62	51	1.88	100.00	71		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	71/80
	RNAi cathD RU486 (+)		42.29	1.40	44	3.21	86.27	59	0.000		0.724	0.000	0.203	0.000	63/78
	RNAi cathD RU486 (-) / Rib		40.55	1.49	42	3.02	82.35	64	0.000	0.724		0.000	0.792	0.000	68/80
	RNAi cathD RU486 (+) / Rib		33.68	1.26	34	0.746	66.66	55	0.000	0.000	0.000		0.000	0.001	72/80
	RNAi cathD RU486 (-) / LF		40.96	1.37	44	1.64	86.27	56	0.000	0.203	0.792	0.000		0.000	68/80
	RNAi cathD RU486 (+) / LF		27.42	1.22	25	1.28	48.02	54	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000		73/80

Πίνακας 4

P < 0.01

10. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ: ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Differential regulation of proteasome functionality in reproductive *vs.* somatic tissues of *Drosophila* during aging or oxidative stress

Eleni N. Tsakiri,* Gerasimos P. Sykiotis,[†] Issidora S. Papassideri,*
Vassilis G. Gorgoulis,[‡] Dirk Bohmann,[§] and Ioannis P. Trougakos^{*,1}

*Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens, Greece; [†]Division of Endocrinology, Department of Internal Medicine, University of Patras Medical School, Patras, Greece; [‡]Department of Histology and Embryology, School of Medicine, University of Athens, Athens, Greece; and [§]Department of Biomedical Genetics, University of Rochester Medical Center, Rochester, New York, USA

ABSTRACT Proteasome is central to proteostasis maintenance, as it degrades both normal and damaged proteins. Herein, we undertook a detailed analysis of proteasome regulation in the *in vivo* setting of *Drosophila melanogaster*. We report that a major hallmark of somatic tissues of aging flies is the gradual accumulation of ubiquitinated and carbonylated proteins; these effects correlated with a ~50% reduction of proteasome expression and catalytic activities. In contrast, gonads of aging flies were relatively free of proteome oxidative damage and maintained substantial proteasome expression levels and highly active proteasomes. Moreover, gonads of young flies were found to possess more abundant and more active proteasomes than somatic tissues. Exposure of flies to oxidants induced higher proteasome activities specifically in the gonads, which were, independently of age, more resistant than soma to oxidative challenge and, as analyses in reporter transgenic flies showed, retained functional antioxidant responses. Finally, inducible Nrf2 activation in transgenic flies promoted youthful proteasome expression levels in the aged soma, suggesting that age-dependent Nrf2 dysfunction is causative of decreasing somatic proteasome expression during aging. The higher investment in proteostasis maintenance in the gonads plausibly facilitates proteome stability across generations; it also provides evidence in support of the trade-off theories of aging.—Tsakiri, E. N., Sykiotis, G. P., Papassideri, I. S., Gorgoulis, V. G., Bohmann, D., Trougakos, I. P. Differential regulation of proteasome functionality in reproductive *vs.* somatic tissues of

Drosophila during aging or oxidative stress. *FASEB J.* 27, 000–000 (2013). www.fasebj.org

Key Words: antioxidant response elements • gonads • Keap1 • Nrf2

ORGANISMAL AGING HAS BEEN defined as a progressive shrinkage of the homeodynamic space that promotes time-dependent decline of functional capacity and stress resistance, associated with increased risk of morbidity and mortality (1, 2, 3). Therefore, and in sharp contrast to the precisely regulated molecular events that take place during development, aging is envisioned as a more stochastic and multifactorial process being modulated by both genetic and environmental factors (4, 5). According to the free radical theory of aging, because of their high reactivity, oxygen free radicals are causally related to the onset and promotion of aging; recently, the more general molecular damage theory of aging has been proposed, based on the fact that damage to biomolecules can also originate from mechanisms in which free radicals are not always the main cause (5, 6). At the tissue and organ level, damage accumulation is a hallmark of aging and affects both postmitotic and mitotic cells, as well as the extracellular matrix (6, 7). Nevertheless, for a relatively long time (at least up to maturation), organisms retain low levels of dysfunctional biomolecules and, apparently, maintain their reproductive cell lineages (germ line) at a high-quality level that preserves viability across generations. This is achieved *via* the occurrence of a complex and highly regulated network of effective surveillance, maintenance, and clearance systems that ensure biomolecules' functionality, thus preventing disruption of organism

Abbreviations: AGE, advanced glycation end product; ARE, antioxidant response element; C-L, caspase-like; CncC, cap'n'collar isoform C; CT-L, chymotrypsin-like; DNP, 1,3-dinitrophenylhydrazine; GFP, green fluorescent protein; gstD1, glutathione S-transferase Delta-1; Keap1, Kelch-like ECH-associated protein 1; Nrf2, NFE2-related factor 2; PCR, polymerase chain reaction; ROS, reactive oxygen species; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; t-BHP, *tert*-butyl hydroperoxide; T-L, trypsin-like; UPS, ubiquitin-proteasome system

¹ Correspondence: Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 15784, Greece. E-mail: itrougakos@biol.uoa.gr
doi: 10.1096/fj.12-221408

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.



Aging Cell

ISSN 1474-9718

Volume 12

Issue 5

October 2013

- MicroRNAs suppress cell senescence
- Rapamycin rescues late-life heart dysfunction
- Through the ages: expression profiling of multiple tissue types
- Anti-aging Long Non-coding RNAs
- **Nrf2 in the fight against proteotoxicity**
- ER-stressed old macrophages: IRE1a to the rescue
- General control and TOR signaling go hand in hand
- Cryptochrome enhances healthspan

WILEY
Blackwell

ANATOMICAL
SOCIETY

www.aging-cell.com

Proteasome dysfunction in *Drosophila* signals to an Nrf2-dependent regulatory circuit aiming to restore proteostasis and prevent premature aging

Eleni N. Tsakiri,¹ Gerasimos P. Sykiotis,²
Issidora S. Papassideri,¹ Evangelos Terpos,³
Meletios A. Dimopoulos,³ Vassilis G. Gorgoulis,^{4,5}
Dirk Bohmann⁶ and Ioannis P. Trougakos¹

¹Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 15784, Greece

²Division of Endocrinology, Department of Internal Medicine, University of Patras Medical School, Patras 26500, Greece

³Department of Clinical Therapeutics, School of Medicine, University of Athens, Athens 11528, Greece

⁴Department of Histology and Embryology, School of Medicine, University of Athens, Athens 11527, Greece

⁵Biomedical Research Foundation, Academy of Athens, Athens 11527, Greece

⁶Department of Biomedical Genetics, University of Rochester Medical Center, Rochester, NY 14642, USA

Summary

The ubiquitin–proteasome system is central to the regulation of cellular proteostasis. Nevertheless, the impact of *in vivo* proteasome dysfunction on the proteostasis networks and the aging processes remains poorly understood. We found that RNAi-mediated knockdown of 20S proteasome subunits in *Drosophila melanogaster* resulted in larval lethality. We therefore studied the molecular effects of proteasome dysfunction in adult flies by developing a model of dose-dependent pharmacological proteasome inhibition. Impaired proteasome function promoted several 'old-age' phenotypes and markedly reduced flies' lifespan. In young somatic tissues and in gonads of all ages, loss of proteasome activity induced higher expression levels and assembly rates of proteasome subunits. Proteasome dysfunction was signaled to the proteostasis network by reactive oxygen species that originated from malfunctioning mitochondria and triggered an Nrf2-dependent upregulation of the proteasome subunits. RNAi-mediated Nrf2 knockdown reduced proteasome activities, flies' resistance to stress, as well as longevity. Conversely, inducible activation of Nrf2 in transgenic flies upregulated basal proteasome expression and activity independently of age and conferred resistance to proteotoxic stress. Interestingly, prolonged Nrf2 overexpression reduced longevity, indicating that excessive activation of the proteostasis pathways can be detrimental. Our *in vivo* studies add new knowledge on the proteotoxic stress-related regulation of the proteostasis networks in higher metazoans. Proteasome dysfunction triggers the activation of an Nrf2-dependent tissue- and age-specific regulatory circuit aiming to adjust the cellular proteasome activity

according to temporal and/or spatial proteolytic demands. Prolonged deregulation of this proteostasis circuit accelerates aging.

Key words: Aging; *Drosophila*; Keap1; Nrf2; proteasome; somatic tissue.

Introduction

Organismal aging is a multifactorial process modulated by the interplay between genetic and environmental factors, and it affects most, if not all, tissues and organs of the body (Kirkwood, 2005; Kourtis & Tavernarakis, 2011). At the tissue level, aging-related damage of biomolecules affects all types of cells and the extracellular matrix. The clearance of proteome damage (or proteotoxic stress) is largely mediated by the concerted activities of the two main cellular proteolytic systems, namely the proteasome (Breusing & Grune, 2008) and the lysosome (Hubbard *et al.*, 2012).

Proteasome is involved in the degradation of both normal short-lived ubiquitinated proteins and mutated or damaged proteins, thereby regulating a vast number of cellular functions (Navon & Ciechanover, 2009). The 26S proteasome consists of a 20S core particle bound to 19S regulatory particles; the latter are involved in substrate recognition, deubiquitination, unfolding, and translocation into the core particle (Navon & Ciechanover, 2009). The 20S eukaryotic proteasome comprises of four stacked heptameric rings (two α type surrounding two of β type) that form a barrel-like structure. The α subunits restrict substrate entry, while the β subunits contribute to the proteolytic active sites, namely the caspase-like (C-L), trypsin-like (T-L), and chymotrypsin-like (CT-L) activities, which are located at the β 1, β 2, and β 5 proteasome subunits, respectively. The 26S proteasome performs the ATP-dependent degradation of short-lived ubiquitinated proteins, whereas the 20S proteasome mediates the degradation of damaged polypeptides, in a manner that is mostly ATP- and ubiquitin-independent (Kastle & Grune, 2011).

Reportedly, mammalian cells senescence is accompanied by reduced proteasome activity (Chondrogianni *et al.*, 2003). Proteasome functionality was also found to decline with age in cells derived from donors (Carrard *et al.*, 2002) and in somatic tissues of *Drosophila* flies (Fredriksson *et al.*, 2012; Tsakiri *et al.*, 2013). Recent studies have shown that overexpression of the Rpn11 19S proteasome subunit in eclosed *Drosophila* increased lifespan (Tonoki *et al.*, 2009), whereas elevated proteasome capacity extended replicative lifespan in *Saccharomyces cerevisiae* (Kruegel *et al.*, 2011). Conversely, impaired function of the 19S Rpn11 or Rpn10 subunits decreased lifespan in *Drosophila* (Tonoki *et al.*, 2009) or caused larval-pupal polyphasic lethality (Szlanka *et al.*, 2003), respectively. Similarly, heterozygotes of two dominant *Drosophila* missense mutations of the β 2 and β 6 proteasome genes develop normally until metamorphosis, but pupae fail to mature and die before eclosion (Covi *et al.*, 1999). Deletion of the Rpn10 subunit

Correspondence

Ioannis P. Trougakos, Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 15784, Greece.
Tel.: +30-210-7274555; fax: +30-210-7274742; e-mail: itrougakos@biol.uoa.gr

Accepted for publication 22 May 2013



Original Contribution

Diet-derived advanced glycation end products or lipofuscin disrupts proteostasis and reduces life span in *Drosophila melanogaster*

Eleni N. Tsakiri^a, Kalliopi K. Iliaki^a, Annika Höhn^b, Stefanie Grimm^b,
Issidora S. Papassideri^a, Tilman Grune^{b,*}, Ioannis P. Trougakos^{a,**}

^a Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Athens 15784, Greece

^b Institute of Nutrition, Department of Nutritional Toxicology, Friedrich Schiller University Jena, 07743 Jena, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 June 2013

Received in revised form

1 August 2013

Accepted 23 August 2013

Available online 30 August 2013

Keywords:

Advanced glycation end products

Aging

Cathepsin

Drosophila

Lipofuscin

Lysosome

Proteasome

Free radicals

ABSTRACT

Advanced glycation end product (AGE)-modified proteins are formed by the nonenzymatic glycation of free amino groups of proteins and, along with lipofuscin (a highly oxidized aggregate of covalently cross-linked proteins, sugars, and lipids), have been found to accumulate during aging and in several age-related diseases. As the *in vivo* effects of diet-derived AGEs or lipofuscin remain elusive, we sought to study the impact of oral administration of glucose-, fructose-, or ribose-modified albumin or of artificial lipofuscin in a genetically tractable model organism. We report herein that continuous feeding of young *Drosophila* flies with culture medium enriched in AGEs or in lipofuscin resulted in reduced locomotor performance and in accelerated rates of AGE-modified proteins and carbonylated proteins accumulation in the somatic tissues and hemolymph of flies, as well as in a significant reduction of flies health span and life span. These phenotypic effects were accompanied by reduced proteasome peptidase activities in both the hemolymph and the somatic tissues of flies and higher levels of oxidative stress; furthermore, oral administration of AGEs or lipofuscin in flies triggered an upregulation of the lysosomal cathepsin B, L activities. Finally, RNAi-mediated cathepsin D knockdown reduced flies longevity and significantly augmented the deleterious effects of AGEs and lipofuscin, indicating that lysosomal cathepsins reduce the toxicity of diet-derived AGEs or lipofuscin. Our *in vivo* studies demonstrate that chronic ingestion of AGEs or lipofuscin disrupts proteostasis and accelerates the functional decline that occurs with normal aging.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

The nonenzymatic glycation of free amino groups of proteins, lipids, and nucleic acids by reducing sugars and reactive aldehydes results (via the Maillard chemical process) in the formation of advanced glycation end products (AGEs)¹ [1]. This process also occurs slowly in biological systems and contributes to tissue modifications that take place during aging and in various pathologies; thus, the role of AGEs has become increasingly evident in various disorders, including diabetes, cardiovascular diseases, neurodegeneration, and cancer [2,3]. Notably, AGEs are also derived from exogenous sources that mostly relate to a heat-processed AGE-rich diet [4]. Specifically, the AGE content in the same food can vary significantly as a result of different temperatures and conditions of

processing, as food that is processed at lower temperatures (or eaten raw) has a low concentration of AGEs, whereas foods with high lipid and protein content prepared at high temperatures are characterized by increased content of AGEs [5].

Lipofuscin is a yellow-brown material that is a highly oxidized cross-linked aggregate largely consisting of oxidized protein and lipid clusters [6]. Proteins within lipofuscin are linked by intermolecular and intramolecular cross-links, mostly caused by oxidation products such as 4-hydroxy-2-nonenal, resulting in a final product that is resistant to degradation by cellular proteolytic systems [6–8]. The rate of lipofuscin formation increases with age and it depends on the rate of oxidative damage to proteins, as well as on the proteolytic systems and mitochondrial functionality [6,9,10].

Organismal aging correlates with the time-dependent decline in functional capacity and stress resistance, associated with increased risk of morbidity and mortality [11–13]. According to the “molecular damage” theory of aging, age-related accumulation of damaged biomolecules is a hallmark of aging and affects both postmitotic and mitotic cells, as well as the extracellular matrix [12,14,15]. Nevertheless, at least up to maturation, organisms retain low levels of damaged molecules via the action of a complex and highly regulated network of effective surveillance, maintenance, and

Abbreviations: ALS, autophagy–lysosome system; AGE, advanced glycation end product; BSA, bovine serum albumin; C-L, caspase-like; CT-L, chymotrypsin-like; Frc, fructose; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Glc, glucose; LF, lipofuscin; CML, N^ε-(carboxymethyl)lysine; PN, proteostasis network; RAGE, receptor for AGEs; Rib, ribose; ROS, reactive oxygen species; T-L, trypsin-like; UPS, ubiquitin–proteasome system

* Corresponding author. Fax: +49 364 1949672.

** Corresponding author. Fax: +30 210 7274742.

E-mail addresses: tilman.grune@uni-jena.de (T. Grune), itrougakos@biol.uoa.gr (I.P. Trougakos).

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Prothymosin α and a prothymosin α -derived peptide enhance T_H1 -type immune responses against defined HER-2/neu epitopes

Kyriaki Ioannou¹, Evelyn Derhovanessian², Eleni Tsakiri³, Pinelopi Samara¹, Hubert Kalbacher⁴, Wolfgang Voelter⁴, Ioannis P Trougakos³, Graham Pawelec² and Ourania E Tsitsilonis^{1*}

Abstract

Background: Active cancer immunotherapies are beginning to yield clinical benefit, especially those using peptide-pulsed dendritic cells (DCs). Different adjuvants, including Toll-like receptor (TLR) agonists, commonly co-administered to cancer patients as part of a DC-based vaccine, are being widely tested in the clinical setting. However, endogenous DCs in tumor-bearing individuals are often dysfunctional, suggesting that *ex vivo* educated DCs might be superior inducers of anti-tumor immune responses. We have previously shown that prothymosin alpha (proTa) and its immunoreactive decapeptide proTa(100–109) induce the maturation of human DCs *in vitro*. The aim of this study was to investigate whether proTa- or proTa(100–109)-matured DCs are functionally competent and to provide preliminary evidence for the mode of action of these agents.

Results: Monocyte-derived DCs matured *in vitro* with proTa or proTa(100–109) express co-stimulatory molecules and secrete pro-inflammatory cytokines. ProTa- and proTa(100–109)-matured DCs pulsed with HER-2/neu peptides induce T_H1 -type immune responses, prime autologous naïve CD8-positive (+) T cells to lyse targets expressing the HER-2/neu epitopes and to express a polyfunctional profile, and stimulate CD4+ T cell proliferation in an HER-2/neu peptide-dependent manner. DC maturation induced by proTa and proTa(100–109) is likely mediated *via* TLR-4, as shown by assessing TLR-4 surface expression and the levels of the intracellular adaptor molecules TIRAP, MyD88 and TRIF.

Conclusions: Our results suggest that proTa and proTa(100–109) induce both the maturation and the T cell stimulatory capacity of DCs. Although further studies are needed, evidence for a possible proTa and proTa(100–109) interaction with TLR-4 is provided. The initial hypothesis that proTa and the proTa-derived immunoactive decapeptide act as “alarmins”, provides a rationale for their eventual use as adjuvants in DC-based anti-cancer immunotherapy.

Keywords: Prothymosin alpha, Immunoreactive peptide, Dendritic cells, T_H1 immune responses, TLR-4, Adjuvant, HER-2/neu peptides

Background

Anti-cancer vaccines are designed to break tolerance to self and stimulate strong and durable anti-tumor immunity. Administering defined tumor-derived epitopes to cancer patients for the activation of helper and cytotoxic T cells has been shown to enhance anti-cancer immune responses *in vivo* and in some cases to lead to

objective clinical responses [1-3]. To optimize the efficacy of peptide-based anti-cancer vaccines, combinatorial approaches stimulating both innate and adaptive immunity are now being clinically evaluated [4,5]. Mature dendritic cells (DCs) are key players for eliciting such responses, as they present antigens to T cells and provide the necessary co-stimulatory signals and cytokines favoring the efficient activation of tumor-reactive immune cells [6,7]. DC maturation can be induced *in vivo* upon admixing and co-administering immunogenic peptides with adjuvants, but to date this strategy

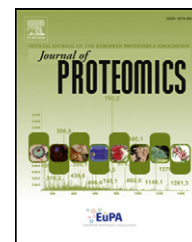
* Correspondence: rtsitsil@biol.uoa.gr

¹Department of Animal and Human Physiology, Faculty of Biology, University of Athens, Athens 15784, Greece

Full list of author information is available at the end of the article

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jprot

Review

Non-enzymatic post-translational protein modifications and proteostasis network deregulation in carcinogenesis☆

Ioannis P. Trougakos^{a,*}, Fabiola Sesti^a, Eleni Tsakiri^a, Vassilis G. Gorgoulis^{b,c}^aDepartment of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 15784, Greece^bMolecular Carcinogenesis Group, Department of Histology and Embryology, School of Medicine, University of Athens, 11527 Athens, Greece^cBiomedical Research Foundation, Academy of Athens, 11527 Athens, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 January 2013

Accepted 27 February 2013

Keywords:

Aging

Antioxidant responses

Cancer

Protein machine

Proteome aging

Proteostasis

ABSTRACT

Organisms are constantly challenged by stressors and thus the maintenance of biomolecules functionality is essential for the assurance of cellular homeostasis. Proteins carry out the vast majority of cellular functions by mostly participating in multimeric protein assemblies that operate as protein machines. Cells have evolved a complex proteome quality control network for the rescue, when possible, or the degradation of damaged polypeptides. Nevertheless, despite these proteostasis ensuring mechanisms, new protein synthesis, and the replication-mediated dilution of proteome damage in mitotic cells, the gradual accumulation of stressors during aging (or due to lifestyle) results in increasingly damaged proteome. Non-enzymatic post-translational protein modifications mostly arise by unbalanced redox homeostasis and/or high glucose levels and may cause disruption of proteostasis as they can alter protein function. This outcome may then increase genomic instability due to reduced fidelity in processes like DNA replication or repair. Herein, we present a synopsis of the major non-enzymatic post-translation protein modifications and of the proteostasis network deregulation in carcinogenesis. We propose that activation of the proteostasis ensuring mechanisms in premalignant cells has tumor-preventive effects, whereas considering that over-activation of these mechanisms represents a hallmark of advanced tumors, their inhibition provides a strategy for the development of anti-tumor therapies.

This article is part of a Special Issue entitled: Protein Modifications.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	0
2. Major non-enzymatic post-translational protein modifications	0
2.1. Oxidation	0
2.2. Glycation	0
2.3. Other non-enzymatic covalent modifications of proteins	0

☆ This article is part of a Special Issue entitled: Protein Modifications.

* Corresponding author. Tel.: +30 210 7274555; fax: +30 210 7274742.

E-mail address: itrougakos@biol.uoa.gr (I.P. Trougakos).

1874-3919/\$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.02.024>Please cite this article as: Trougakos IP, et al, Non-enzymatic post-translational protein modifications and proteostasis network deregulation in carcinogenesis, J Prot (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.02.024>